



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RUYANNE ANDREZA CAMILO SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
AGROTÓXICOS (PERTURBADORES ENDÓCRINOS) EM ÁGUA**

***DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF  
PESTICIDES (ENDOCRINE DISRUPTIVE) IN WATER***





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RUYANNE ANDREZA CAMILO SANTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, da Universidade Federal de  
Sergipe, para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
AGROTÓXICO (PERTURBADORES ENDÓCRINOS) EM ÁGUA**

**Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene**

***DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF  
PESTICIDES (ENDOCRINE DISRUPTIVE) IN WATER***

*Master Dissertation presented to the  
Graduate Program in Chemistry of the  
Federal University of Sergipe to obtain  
MSc. in Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237d Santos, Ruyanne Andreza Camilo  
Desenvolvimento de método para determinação de agrotóxico  
(perturbadores endócrinos) em água / Ruyanne Andreza Camilo  
Santos ; orientador Sandro Navickiene. - São Cristóvão, 2016.  
77 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de  
Sergipe, 2016.

1. Água - Poluição. 2. Água - Purificação. 3. Agrotóxicos. 4.  
Biocarvão. 5. Extração (Química). 6. Adsorção. I. Navickiene,  
Sandro, Orient. II. Título.

CDU 543.393



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SERGIPE

Programa de Pós-graduação em  
Química - PPGQ



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação  
de Mestrado de Ruyanne Andreza Camilo Santos  
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Sergipe em  
26/02/2016.

Prof. Dr. Sandro Navickiene  
Departamento de Química-UFS

Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira  
Departamento de Química Geral e Inorgânica - UFBA

Prof. Dr. Alain Gaujac  
Instituto Federal de Sergipe - Campus São Cristóvão

## RESUMO

A poluição aquática provoca mudanças nas características físicas, químicas e biológicas das águas, as quais interferem na sua qualidade, impossibilitando o seu uso para o consumo humano. A maioria dos contaminantes químicos presentes em águas superficiais estão relacionados às fontes industriais e agrícolas. Uma vez que, com a atividade agrícola o Brasil polui os recursos hídricos existentes fazendo uso de agrotóxicos e fertilizantes. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método rápido e eficiente baseado nas técnicas de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico na região do ultravioleta e visível com arranjo de diodos (HPLC UV-Vis/DAD) para a determinação dos agrotóxicos, perturbadores endócrinos, epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol, e vinclozolina, em água, utilizando biocarvões produzidos a partir de rejeitos de agroindústria, como adsorvente alternativo para a SPE. Testes realizados com os analitos permitiram o ajuste das condições cromatográficas para análise simultânea de cinco agrotóxicos selecionados. A condição ótima de extração dos analitos consistiu em utilizar 0,5 g do adsorvente para 50 mL de água ultrapurificada e eluição com 5 mL de acetonitrila. O biocarvão produzido a partir de rejeitos de coco foi testado como adsorvente para a extração por SPE e apresentou resultados satisfatórios de recuperação entre  $75 \pm 9\%$  –  $119 \pm 12\%$  para os níveis de concentração 0,5 a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os parâmetros estudados para a validação do método foram: linearidade e sensibilidade, obtendo-se uma boa sensibilidade e resposta linear com coeficientes de 0,9998 no intervalo de 0,01 a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; precisão com base nos estudos de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), obtendo-se resultados de 0,1–1%, 0,6–1%, respectivamente; exatidão com valores de recuperação entre  $60 \pm 37\%$  –  $117 \pm 3\%$ , para os níveis de concentração 0,025 a  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $75 \pm 9\%$  –  $119 \pm 12\%$  para os níveis 0,5 a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com relação ao C<sub>18</sub> e o biocarvão, respectivamente. O LD no intervalo de 0,01–0,025 e LQ 0,025–0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O método desenvolvido se mostrou adequado para determinação de agrotóxicos em amostras de água.

**PALAVRAS-CHAVES:** Água, Agrotóxicos, Perturbadores Endócrinos, SPE, Adsorvente Alternativo, Biocarvão, HPLC UV-VIS/DAD.

## ABSTRACT

*The water pollution causes changes in physical, chemical and biological water, which interfere with their quality, preventing its use for human consumption. Most chemical contaminants in surface water are related to industrial and agricultural sources. Since, with farming the Brazil pollute existing water resources making use of pesticides and fertilizers. This study aims to develop a fast and efficient method based on extraction techniques in solid phase (SPE) and high-performance liquid chromatography with UV detection in the ultraviolet and visible with diode array (HPLC UV-Vis / DAD) for the determination of pesticides, endocrine disruptors, epoxiconazole, fenarimol, fenbuconazole, flusilazole, flutriafol, and vinclozolin in water using biocarvões produced from agro-industry waste as an alternative sorbent for SPE. Tests with the analytes allowed the adjustment of the chromatographic conditions for simultaneous analysis of five selected pesticides. The optimal condition for the extraction of analytes was performed using 0.5 g of adsorbent to 50 mL of ultrapure water and eluted with 5 mL of acetonitrile. The biochar produced from coconut waste was tested as an adsorbent for the extraction by SPE and showed good recovery results between  $75\% \pm 9$  -  $119 \pm 12\%$  for the concentration levels of 0.5 to  $1 \text{ ug mL}^{-1}$ . The parameters studied to validate the method were: linearity and sensitivity, obtaining a good sensitivity and linear response with 0.9998 coefficients in the range of 0.01 to  $10 \text{ ug mL}^{-1}$ ; precision based on the precision of measurements (Intra) and intermediate precision (interday), obtaining results of 0.1-1%, 0.6-1%, respectively; accuracy with recovery values of  $60 \pm 37\%$  -  $117 \pm 3\%$  to the concentration levels of from 0.025 to  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  and  $75 \pm 9\%$  -  $119 \pm 12\%$  for levels 0.5 to  $1 \text{ ug mL}^{-1}$  related to the biochar and  $C_{18}$ , respectively. The LD 0.01 to 0.025 in range and LQ from 0.025 to  $0.5 \text{ ug mL}^{-1}$ . The method developed was adequate for the determination of pesticides in water samples.*

**KEYWORDS:** Water, Pesticides, Endocrine Disruptors, Alternative Sorbent, Biochar, HPLC UV-VIS/DAD.

*Aos meus pais, Ruy e Betânia, e avó Lourdes, por  
todo afeto, esforço, incentivo e confiança.*

*Dedico*

*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.*

Albert Einstein



## AGRADECIMENTOS

A DEUS, agradeço por ser meu refúgio e fortaleza nas horas mais difíceis, ajudando-me a não desistir. Eu sei que Sua graça se faz presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Ruy e Betânia, por todo amor, incentivo e segurança de sempre. Sem vocês certamente eu não teria conseguido.

Ao meu namorado, João Almeida, por todo amor, apoio, cuidado e compreensão. Os quais foram imprescindíveis para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Sandro Navickiene, cujo me faltam palavras para agradecer a inigualável orientação. Obrigada pela paciência, conselhos e ensinamentos. Levarei seu exemplo de responsabilidade, profissionalismo e dedicação durante toda vida.

Aos meus queridos amigos por sempre estarem presentes na minha vida e torcerem por minhas conquistas.

Aos amigos conquistados durante o mestrado os quais quero levar por toda vida, obrigada pela força.

Aos colegas do LCP 1, LCP 2 e LEMON por tornarem mais leves e divertidos os últimos anos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Química por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Alberto Wisniewski Jr, Ingrid e Fernanda do grupo PEB - UFS, pelos biocarvões cedidos.

Ao Prof. Antônio Mangrich e Tassya Matos do LABPPAM da UFPR pela produção dos biocarvões usados no desenvolvimento do trabalho.

Ao PPGQ e a CAPES pelo custeio do projeto desenvolvido. Processo de Nº 5525818/2011-5 referente à Chamada Pública MCT/CNPq/ MEC/ CAPES-Ação transversal Nº 6/2011-Casadinho/Procad.

## Sumário

<b>1- INTRODUÇÃO</b>	1
1.1- Contaminação da Água	3
1.2- Agrotóxicos	3
1.2.1- <i>Perturbadores Endócrinos</i>	5
1.3- Extração em Fase Sólida	10
1.4- Adsorventes Alternativos	12
1.4.1- <i>Biocarvão</i>	12
1.5- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	13
1.6- Validação do método analítico	15
1.7- Revisão da Literatura	17
<b>2- OBJETIVOS</b>	21
2.1- Geral	21
2.2- Específicos	21
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b>	22
3.1- Materiais	22
3.2- Reagentes e padrões de agrotóxicos	22
3.3- Equipamentos	22
3.4- Preparo das soluções padrão	23
3.5- Obtenção do biocarvão	23
3.5.1- <i>Biomassa de rejeitos de goiaba</i>	23
3.5.2- <i>Biomassa da planta Aguapé (Eichhornia crassipes)</i>	24
3.5.3- <i>Biomassa de rejeitos de coco e laranja</i>	25
3.6- Caracterização dos biocarvões	26
3.7- Procedimentos de limpeza do biocarvão de coco	27
3.7.1- <i>Lavagem com metanol</i>	27
3.7.2- <i>Lavagem com água deionizada</i>	27
3.7.3- <i>Ultrassom</i>	28
3.8- Procedimento de extração dos agrotóxicos por SPE	28
3.9- Condições operacionais do sistema cromatográfico para análise dos agrotóxico	28
3.10- Aplicação em amostra real	30
3.11- Limpeza da vidraria	30
3.12- Descartes dos reagentes	30
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	31
4.1- Otimização das condições cromatográficas de análise	31
4.1.1- <i>Testes da composição da fase estacionária</i>	35

4.1.3- Testes da vazão da fase móvel.....	44
4.2- Otimização do preparo de amostra utilizando a extração em fase sólida (SPE)...	46
4.2.1- Seleção do adsorvente .....	47
4.3- Otimização da SPE utilizando o biocarvão como adsorvente alternativo .....	49
4.3.1- Seleção do biocarvão .....	49
4.3.2- Caracterização do biocarvões avaliados.....	53
4.3.2.1- Análise Elementar (CHN).....	53
4.3.2.2- Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) .....	54
4.3.2.3- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	55
4.3.2.4- Determinação da Área Superficial.....	57
4.3.3- Otimização empregando o biocarvão de coco como adsorvente alternativo para SPE .....	58
4.3.4- Etapa de limpeza do biocarvão de coco.....	61
4.4- Validação do método analítico .....	62
4.4.1- Linearidade e Sensibilidade .....	63
4.4.2- Precisão e Exatidão.....	64
4.4.3- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	65
4.5- Aplicação do método em amostra real .....	66
<b>5- CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>6- REFERÊNCIAS</b> .....	69

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fórmulas estruturais dos agrotóxicos selecionados. **FONTE:** TOMLIN, 1994 [31]..... 6
- Figura 2:** Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um composto (ou classe de compostos). **FONTE:** Adaptado de CALDAS, 2011 [10]. ..... 11
- Figura 3:** Esquema de cromatografia líquida de alta eficiência. **FONTE:** (ISSUFO, 2009) [45]..... 14
- Figura 4:** Processo de obtenção do biocarvão de coco..... 26
- Figura 5:** Espectros de absorção dos agrotóxicos..... 33
- Figura 6:** Sobreposição dos cromatogramas das soluções padrão dos agrotóxicos analisados individualmente em  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  por HPLC UV-Vis/DAD. Para condições de análise ver a Tabela A no apêndice..... 34
- Figura 7:** Estrutura química da coluna Synergi RP-80 Å. **FONTE:** PHENOMENEX, 2015..... 36
- Figura 8:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver Tabela A no apêndice..... 36
- Figura 9:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela A no apêndice..... 37
- Figura 10:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol e, concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela A no apêndice..... 38
- Figura 11:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela B no apêndice..... 39
- Figura 12:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela C no apêndice. .... 40

- Figura 13:** Cromatogramas obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução mix dos padrões selecionados em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela C no apêndice. (A)  $35^\circ\text{C}$ ; (B)  $30^\circ\text{C}$ . ..... 41
- Figura 14:** Sobreposição dos cromatogramas das análises do metanol puro e da solução fenbuconazol e flusilazol em  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  por HPLC UV-Vis/DAD. Para condições de análise ver a Tabela D no apêndice. 42
- Figura 15:** Sobreposição dos cromatogramas das soluções padrão dos agrotóxicos analisados individualmente em  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  por HPLC UV-VIS/DAD. Ver condições de análise na Tabela D em apêndice. .... 43
- Figura 16:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos 5 padrões em concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . (A) 1,0 (B) 0,8 (C) 0,6 (D)  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela E no apêndice..... 45
- Figura 17:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-VIS/DAD das análises dos extratos com diferentes adsorventes em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver tópico 3.9. .... 48
- Figura 18:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-VIS/DAD das análises dos extratos em  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  e do branco empregando o biocarvão de goiaba como adsorvente. Para condições de análise ver tópico 3.9. .... 50
- Figura 19:** Extração utilizando o biocarvão de goiaba como adsorvente..... 51
- Figura 20:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-VIS/DAD das análises dos extratos em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , extraídas utilizando diferentes biocarvões como adsorvente da SPE. Para condições de análise ver tópico 3.9..... 52
- Figura 21:** Espectros de absorção na região do Infravermelho dos biocarvões estudados..... 55
- Figura 22:** Microscopia de varredura dos biocarvões estudados. (A) Aguapé; (B) Coco; (C) Goiaba; (D) Laranja. .... 56

**Figura 23:** Sobreposição dos cromatogramas das soluções de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtidos a partir da variação da massa do adsorvente de coco..... 59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Informações sobre os perturbadores endócrinos selecionados para o estudo. <b>FONTE:</b> TOMLIN, 1994; Mnif, 2011[31,6].	8
<b>Tabela 2:</b> Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados. <b>FONTE:</b> IUPAC, 2015 [32].	9
<b>Tabela 3:</b> Trabalhos descritos na literatura sobre a determinação de agrotóxicos em água utilizando a SPE.	20
<b>Tabela 4:</b> Condições experimentais para produção do biocarvão de rejeitos goiaba em forno rotativo FRO - 1100.	24
<b>Tabela 5:</b> Condições experimentais para produção do biocarvão de aguapé em forno rotativo FRO - 1100.	25
<b>Tabela 6:</b> Programação da fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O.	29
<b>Tabela 7:</b> Especificações das colunas utilizadas.	35
<b>Tabela 8:</b> Tempo de retenção dos agrotóxicos estudados. Para condições cromatográficas de análise ver item 3.8.	46
<b>Tabela 9:</b> Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em água em 10 µg mL <sup>-1</sup> , por SPE utilizando o adsorventes comerciais e HPLC UV-VIS/DAD.	48
<b>Tabela 10:</b> Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em água em 10 µg mL <sup>-1</sup> , por SPE utilizando biocarvões como adsorvente e HPLC UV-VIS/DAD.	53
<b>Tabela 11:</b> Teor de C, H, N e O dos biocarvões estudados.	53
<b>Tabela 12:</b> Área superficial dos biocarvões estudados.	57
<b>Tabela 13:</b> Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em água em 10 µg mL <sup>-1</sup> , por SPE utilizando diferentes quantidades do biocarvões como adsorvente.	59

<b>Tabela 14:</b> Influência do volume do eluente na eficiência da extração dos agrotóxicos em água em $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando o biocarvão de coco como adsorvente da SPE. ....	60
<b>Tabela 15:</b> Eficiência das etapas de limpeza do biocarvão em concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .....	61
<b>Tabela 16:</b> Valores de recuperação média dos agrotóxicos em água por SPE utilizando o biocarvão de coco como adsorvente e HPLC UV-VIS/DAD. ....	62
<b>Tabela 17:</b> Valores de coeficientes de determinação e equações da reta dos agrotóxicos estudados em um intervalo de concentração de $0,01 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . ....	63
<b>Tabela 18:</b> Valores de precisão intradia e interdia dos agrotóxicos em concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . ....	64
<b>Tabela 19:</b> Coeficiente de variação do método SPE para determinação de agrotóxicos em água utilizando $\text{C}_{18}$ e biocarvão como adsorvente.....	65
<b>Tabela 20:</b> Limite de Detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método utilizando o $\text{C}_{18}$ e o biocarvão como adsorvente da SPE.....	66
<b>Tabela 21:</b> Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em amostra de água real fortificada em $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , por SPE utilizando biocarvão de coco como adsorvente.....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CD - Constante de Dissociação

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Pressão)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LLE - *Liquid-Liquid Extraction* (Extração Líquido-Líquido)

LMR's – Limites máximos de resíduos

MM – Massa molar

PD - Ponto de Degradação

PF – Ponto de Fusão

SDVB - Estireno Divinil Benzeno

SPE – *Solid Phase Extration* (Extração em fase sólida)

## 1- INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial e do setor econômico primário conduz a um aumento da produção agrícola que, conseqüentemente, tem intensificado o uso de terras para suprir a demanda por alimentos no mundo. Isto tem despertado grande preocupação em virtude dos impactos que vem causando ao ambiente, sobretudo no que diz respeito à contaminação dos recursos hídricos por insumos agrícolas, como nutrientes e agrotóxicos [1,2].

A maioria dos contaminantes químicos presentes em águas subterrâneas e superficiais está relacionada às fontes industriais e agrícolas. Pois, sabe-se que o Brasil necessita de grandes volumes de água para a atividade agrícola e, por outro lado, polui os recursos hídricos existentes com essa mesma atividade fazendo uso de agrotóxicos e fertilizantes [3].

Os agrotóxicos assumem caráter destacado enquanto contaminantes pelo intenso consumo no país. Sua presença nos mananciais pode trazer dificuldades para o tratamento da água em virtude da eventual necessidade de tecnologias mais complexas do que aquelas normalmente usadas para a potabilização [4].

A intensificação da produção agrícola e do uso de agrotóxicos traz vários riscos para a qualidade do abastecimento de água e como resultado a saúde humana. Intoxicações, toxicidade neurológica aguda, comprometimento do sistema reprodutivo e endócrino, doenças renais crônicas, câncer e até mesmo a morte, podem ser causados pelo uso dos agrotóxicos. De acordo com a Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, os agrotóxicos acarretaram 20 mil óbitos, anualmente, ao longo dos últimos 50 anos [5].

Além disso, muitos agrotóxicos são classificados como perturbadores endócrinos, pois afetam diretamente o sistema endócrino de seres humanos e animais, interferindo na produção dos hormônios naturais por causa do seu potencial em se ligar a receptores de estrogênio ou de androgênio, resultando em diversos efeitos colaterais, comprometendo a função intelectual e o funcionamento do sistema nervoso central [6,7].

Foram reportadas da literatura inúmeras técnicas de extração visando a determinação de agrotóxicos em matrizes aquosas, a exemplo da extração

líquido-líquido (LLE), extração com fluido supercrítico (SFE), extração em fase sólida (SPE) e a micro extração em fase sólida (SPME) [8]. Destacando-se a técnica de extração em fase sólida (SPE) que é do ponto de vista prático, uma cromatografia líquida, em que se usa uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, que contém a fase sólida, um adsorvente capaz de reter os analitos ou interferentes da amostra. Geralmente o  $C_8$ ,  $C_{18}$ , alumina neutra, sílica gel e Florisil [8,9, 10]. No entanto, devido ao alto custo destes materiais, a utilização de adsorventes alternativos, como polímeros de coordenação, nanotubos de carbono, zeólitas, materiais metal-orgânicos e biocarvão têm se mostrado bastante promissora no que diz respeito à remoção de diferentes grupos de poluentes orgânicos, inclusive agrotóxicos [10, 11].

Nesse contexto, a Química verde ou Química sustentável surge com a preocupação de desenvolver tecnologias baseadas em processos que não contribuam para o aumento da poluição [12,13]. Uma das principais áreas de investigação é a utilização de resíduos industriais ou agrícolas como biomassa (massa biológica), a fim de superar os problemas de alto custo e aumentar a produção de novos materiais adsorventes alternativos para substituir os comerciais. Destaca-se a utilização de cascas de frutas ou partes de vegetais, principalmente pelo fato de serem reaproveitados, uma vez que são resíduos da atividade agrícola [14,15].

O biocarvão e o carvão são as principais formas de materiais carbonosos utilizados para a adsorção de agrotóxicos, visto que possuem uma grande área superficial e microporosidade. O biocarvão é produzido como um coproduto durante a queima de biomassa em um sistema fechado sob um fornecimento limitado de oxigênio, denominado de pirólise [16,17].

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a aplicação de biocarvão, produzido a partir de rejeitos de frutas e plantas, como adsorvente alternativo, utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE) na remoção dos agrotóxicos epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol e vinclozolina em água.

## **1.1- Contaminação da Água**

A água constitui um importante recurso natural, indispensável a manutenção da vida no planeta. A quantidade e a qualidade da água potável estão diretamente relacionadas com a saúde humana, devido à sua utilização para o consumo, higiene e produção de alimentos [18].

Dessa maneira, o monitoramento dos recursos hídricos é fundamental, pois a poluição destes tem aumentado notavelmente, sendo os principais responsáveis o crescimento da produção agrícola e industrial, o esgoto sem tratamento, os aterros sanitários, os produtos químicos e os resíduos tóxicos [18,19].

Os agrotóxicos são um dos contaminantes químicos que afetam a saúde de uma parcela da população [1]. Uma vez que a Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes diz que 10 dos 12 produtos químicos mais perigosos e persistentes em água potável são os agrotóxicos. [5].

No Brasil, a Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, estabelece as normas sobre o padrão de potabilidade e qualidade da água para consumo humano, em que são apresentados valores permitidos para as características microbiológicas, organolépticas, físicas e químicas [20].

Visto que a degradação da qualidade dos recursos hídricos, em função da contaminação por agrotóxicos, tem sido alvo de estudos em todo mundo, é fundamental estudar o risco potencial de contaminação por esses insumos, permitindo que medidas de controle sejam adotadas, garantindo o equilíbrio do ecossistema [21].

## **1.2- Agrotóxicos**

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, inclusive quaisquer derivados específicos, tais como

produtos de conservação e de degradação, metabólicos, produtos de reação e de impurezas, considerados tóxicos e ambientalmente importantes [22].

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a sua aplicação a um organismo-alvo. Entre os principais, podem-se citar os inseticidas, que matam insetos; herbicidas destinados a matar plantas e ervas daninha; e fungicidas substâncias usadas para controlar o crescimento de alguns tipos de fungos. Como também podem ser classificados em relação à suas características físico-químicas; quanto à ação, forma de atuação e origem e ainda de acordo com os efeitos à saúde humana [22].

Os agrotóxicos estão divididos em quatro classes toxicológicas (I = rótulo vermelho, II = rótulo amarelo, III = rótulo azul e IV = rótulo verde). A classe I abrange os compostos considerados altamente tóxicos para seres humanos; a II, os mediantemente tóxicos, a III, os pouco tóxicos e a IV, os compostos considerados praticamente não-tóxicos para seres humanos [23]. Compreendem uma extensa variedade de substâncias químicas, a exemplo dos carbamatos, organoclorados, organofosforados, piretróides, triazol, entre outros [24].

Os compostos pertencentes à classe dos azóis diferem entre si com relação às suas estruturas. Os classificados como triazóis possuem em sua estrutura três átomos de nitrogênio, os oxazóis possuem um átomo de nitrogênio e um de oxigênio. Eles são usados na agricultura no controle de fungos e são altamente estáveis, além de apresentar baixa biodegradabilidade, facilitando a contaminação de frutas e vegetais e seus derivados. Eles são classificados como perturbadores endócrinos e são considerados de alta periculosidade para o ambiente e a saúde humana [24].

Os compostos pertencentes à classe pirimidinil carbinol são fungicidas sintéticos que atuam como inibidores da biossíntese do ergosterol, que é um componente da membrana celular dos fungos, de estabilidade média na natureza e apresentam baixa biodegradabilidade [25].

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a utilização de agrotóxicos é a 2ª maior causa de contaminação dos rios no Brasil, seguidos dos esgotos domésticos. Pois, no que diz respeito ao uso destes produtos, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo, embora não seja o maior produtor. O país utiliza 19% de todo defensivo

agrícola produzido no planeta, segundo a ANVISA. Além disso, mais de 99% das formulações aplicados na lavoura não atingem a praga alvo. Então, pode-se dizer que mais de 99% dos agrotóxicos vão para os rios, para o solo, para o ar e para a água subterrânea [26].

Contudo, sabe-se que o seu uso indiscriminado, sem as devidas precauções e cuidados em relação à manipulação, produção, estocagem e destino final, põe em risco não só o meio ambiente, mas também a saúde das pessoas que, de alguma forma, entram em contato com tais produtos [27].

Problemas com agrotóxicos centralizam-se em suas propriedades, como toxicidade seletiva, persistência no ambiente, potencial de bioacumulação e mobilidade, os quais podem ser facilmente lixiviados, quando apresentam alta solubilidade em água contaminando solos, rios e outras plantações [28].

Além disto, pela água ou através do próprio consumo de alimentos, a ingestão de formulações agrícolas pode ocasionar diversos tipos de doenças. Dependendo do tipo de agrotóxicos os efeitos para a saúde humana podem ser morte, envenenamento estomacal, problemas no sistema nervoso, convulsões, lesões nos rins e cânceres [26].

A atual Legislação Brasileira, Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, preocupada com o aumento de micropoluentes - poluentes presentes no meio ambiente em concentrações da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ , regulamenta 68 substâncias químicas que representam riscos à saúde humana, dentre as quais 36 são agrotóxicos, cujos valores máximos permitidos para amostras de água estão entre 0,02 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  [20]. Para LMR's ver o Anexo A.

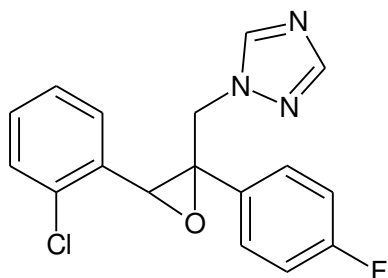
#### *1.2.1- Perturbadores Endócrinos*

Os agrotóxicos podem interferir na síntese, transporte, metabolismo e eliminação de hormônios, diminuindo a concentração de hormônios naturais. A produção dos hormônios tireoidianos, por exemplo, pode ser inibida por alguns perturbadores endócrinos, a exemplo de amitraz, cialotrina, fipronil, ioxinil, maneb, epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, pentacloronitrobenzeno, pirimetanil, tiazopir, zirame e zinebe [29].

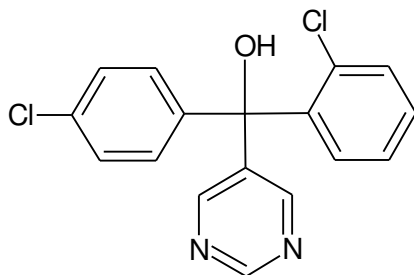
Em nível ambiental, a fauna é particularmente vulnerável aos efeitos dos agrotóxicos, os quais estão relacionados também à desregulação endócrina em invertebrados, répteis, peixe, aves e mamíferos, expostos a agrotóxicos organoclorados que afetam o sistema reprodutor [30]. Nos humanos, os agrotóxicos também podem interromper a ação reprodutiva e o desenvolvimento sexual [6]. A idade é um dos fatores mais importantes no que diz respeito a ação dos agrotóxicos perturbadores endócrinos no ser humano. Os fetos, os lactentes e as crianças apresentam maior susceptibilidade do que os adultos, sendo que grande parte dos danos causados pelos perturbadores endócrinos ocorre durante o início do desenvolvimento do feto. No entanto, os efeitos podem ser evidentes mesmo nos adultos, resultando em diversos efeitos colaterais, incluindo possíveis impactos em longo prazo na função intelectual e no funcionamento do sistema nervoso central [6].

As fórmulas estruturais, informações físico-químicas e efeitos causados na saúde humana são apresentados na Figura 1 e nas Tabelas 1 e 2.

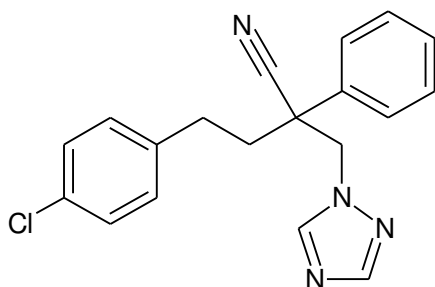
**Figura 1:** Fórmulas estruturais dos agrotóxicos selecionados. **FONTE:** TOMLIN, 1994 [31].



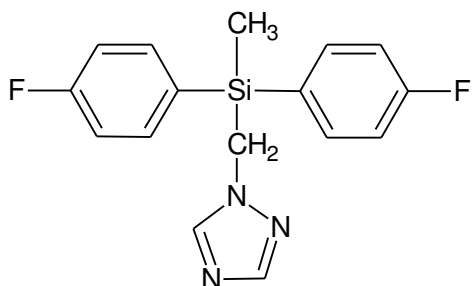
**Epoxiconazol:** (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4 fluorofenil) propil]-1H-1,2,4-triazol.



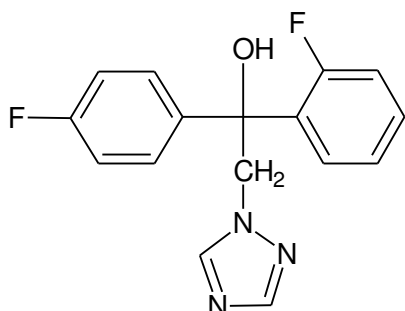
**Fenarimol:** (RS)-2,4'-dicloro-a-(pirimidin-5-il)benzidrido.



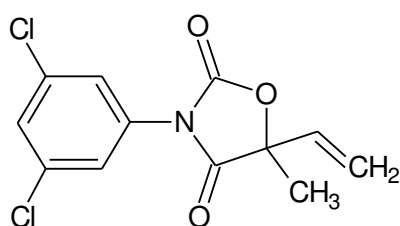
**Fenbuconazol:** 4-(4-clorofenil)-2-fenil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-metilbutironitrilo.



**Flusilazol:** bis(4-fluorofenil)(metil)(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)silano.



**Flutriafol:** (*RS*)-2,4'-difluoro-α- (1H-1,2,4-triazol-1-il-metil) benzidriolo.



**Vinclozolina:** (*RS*)-3-(3,5-diclorofenil)-5-metil-5-vinil-1,3-oxazolidina-2,4-diona.



**Tabela 1:** Informações sobre os perturbadores endócrinos selecionados para o estudo. **FONTE:** TOMLIN, 1994; Mnif, 2011[31,6].

<b>Perturbador Endócrino</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Grupo Químico</b>	<b>Classe Química</b>	<b>Classe Toxicológica</b>	<b>Efeito causado em humanos</b>
Epoxiconazol	$C_{17}H_{13}ClFN_3O$	Fungicida	Triazol	III	Inibição na atividade da aromatase, diminuição na produção de estrogênio e o aumento de androgênios
Fenarimol	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O$	Fungicida	Pirimidinil Carbinol	III	Antagonista de ação androgênica, potencializa a inibição da aromatase e ativação celular do Receptor Pregnano X
Fenbuconazol	$C_{10}H_{11}F_3N_2O$	Fungicida	Triazol	II	Inibição da produção de hormônios da tireóide e Ativação celular do Receptor Pregnano X
Flusilazol	$C_{16}H_{15}F_2N_3Si$	Fungicida	Triazol	III	Inibição na atividade da aromatase, diminuição na produção de estrogênio e o aumento de androgênios
Flutriafol	$C_{16}H_{13}F_2N_3O$	Fungicida	Triazol	III	Fraca inibição de estrogênio
Vinclozolina	$C_{12}H_9Cl_2NO_3$	Fungicida	Oxazol	IV	Competitivo de ligação ao receptor de androgênio. Interações com receptor celular pregnano X e interferência no metabolismo dos hormônios esteróides

I: Altamente; II: Mediamente; III: Pouco; IV: Praticamente Não tóxico.

**Tabela 2:** Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados. **FONTE:** IUPAC, 2015 [32].

<b>Perturbador Endócrino</b>	<b>PF (°C)</b>	<b>PD (°C)</b>	<b>CD pKa (25°C)</b>	<b>MM (g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pressão de Vapor (mPa), 25°C</b>	<b>Solubilidade em água, 20°C (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubilidade em solvente orgânico, 20°C (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Epoxiconazol</b>	136,2	310	-	329,76	$1,00 \times 10^{-2}$	7,1	Acetato de etila - 100000 Acetona - 140000 Etanol – 28800 Tolueno - 40000
<b>Fenarimol</b>	119	-	-	331,20	$65,0 \times 10^{-6}$	13,7	Acetato de etila - 73300 Heptano - 920 Metanol – 98000 Xileno - 33300
<b>Fenbuconazol</b>	126,5	360	-	336,82	$3,4 \times 10^{-4}$	2,5	Acetato de etila – 132000 Acetona - 250000 Heptano- 680 Xileno- 26000
<b>Flusilazol</b>	52,3	-	2,5	315,39	$3,8 \times 10^{-2}$	41,9	Hexano - 85000 Acetato de etila – 200000 Xileno - 200000
<b>Flutriafol</b>	130	270	2,3	301,29	$4,0 \times 10^{-4}$	95,0	Acetona – 116000 Heptano- 300 Metanol – 115000 Xileno - 10000
<b>Vinclozolina</b>	108	-	-	286,11	$1,6 \times 10^{-2}$	3,4	Acetato de etila - 281000 Acetona - 551000 Benzeno- 164000 Xileno - 128000

**PF:** Ponto de Fusão; **PD:** Ponto de Degradação; **CD:** Constante de Dissociação; **MM:** Massa Molar.

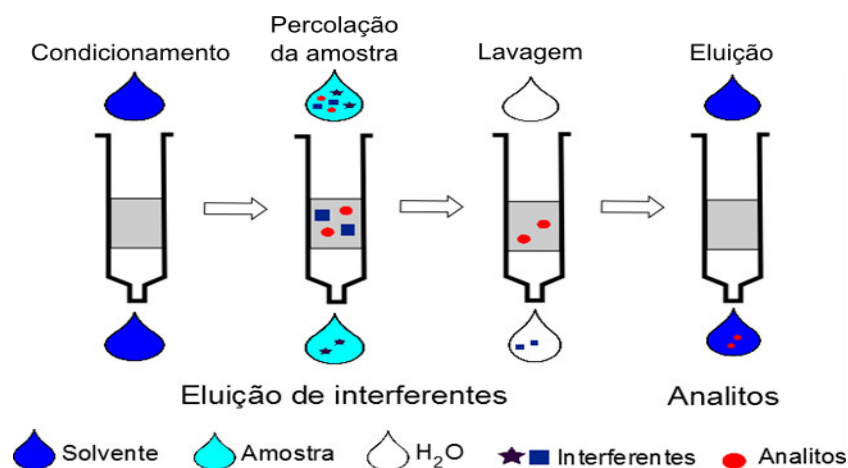
O estudo das propriedades físico-químicas dos perturbadores endócrinos apresentadas na Tabela 2 é importante para o desenvolvimento do trabalho. Sobretudo no que diz respeito à solubilidade, uma vez que o solvente orgânico é de suma importância para a etapa de extração e análise cromatográfica dos analitos. Cada parâmetro pode ser melhor entendido a seguir: Ponto de Fusão (PF): Temperatura em °C necessária para que ocorra a mudança da fase sólida para a líquida. Ponto de degradação (PD): Temperatura em °C em que a substância não é mais estável e inicia o processo de degradação. Constante de dissociação (CD) em 25° C (pKa): Indicador do potencial que o composto tem em formar íons em água. Massa molar (MM): massa dada em gramas de um mol em unidades elementares. Pressão de Vapor (mPa): tendência de uma substância vaporizar e estabelecer um equilíbrio com seu estado líquido [32].

### 1.3- Extração em Fase Sólida

Desenvolvida em meados da década de 1970, a extração em fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica, empregando uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, a qual contém uma fase sólida. É, usualmente, aplicada com o propósito de isolar um ou mais analitos presentes em uma matriz aquosa complexa para posterior análise com o uso de um método instrumental [8].

A Figura 2 esquematiza o processo de extração em fase sólida, em que, após condicionamento da coluna com um ou mais solventes a fim de ativar a fase sólida contida no cartucho, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada por um vácuo – ou pressionada levemente com uma seringa ou gás – de forma a penetrar no cartucho. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente apropriado de forma a coletá-lo em uma concentração apropriada para análise [33].

**Figura 2:** Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um composto (ou classe de compostos). **FONTE:** Adaptado de CALDAS, 2011 [10].



Cada etapa destacada na Figura 2 deve ser otimizada. A exemplo do tipo de adsorvente (fase sólida que faz a extração), o adsorvente precisa interagir com os analitos para que seja capaz de retê-los para uma posterior eluição. Bem como, o solvente que será utilizado nas etapas de condicionamento do cartucho e eluição dos analitos. Assim, é possível selecionar um solvente de eluição que tenha interações com o composto de interesse, mas que também possa ser conveniente para o método de análise, ou para o manuseio subsequente da amostra, ou aplicar etapas de lavagem de modo a assegurar que o extrato final esteja isento de interferentes [34].

A técnica de extração em fase sólida apresenta diferentes finalidades de acordo com a necessidade de trabalho. Dentre eles destacam-se: **Concentração dos analitos**, cujo objetivo principal é passar, através do cartucho, um grande volume de amostra de forma a aprisionar somente o analito, que se encontra extremamente diluído, deixando passar o solvente e interferentes. **Isolamento do analito**, ou *clean-up*, onde a intenção não é o de concentrar a amostra, mas sim, isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. **Isolamento da matriz**, de modo que, ficará retido na fase sólida os interferentes da matriz e não os analitos de interesse (esses passaram direto com o solvente da amostra) e, **estocagem da amostra**, bastante empregado para análise de amostras que se encontram em local distante do laboratório

analítico, com o objetivo de evitar o transporte de grande volumes de amostra [33].

#### **1.4- Adsorventes Alternativos**

Os adsorventes são materiais utilizados na forma natural ou após tratamento químico ou térmico, destinando-se a aumentar a superfície específica por meio da criação de novos poros ou de pontos ativos susceptíveis à fixação de certas substâncias. Em geral, possuem alta capacidade de adsorção e grande área superficial. Embora a maioria dos sólidos possa adsorver em maior ou menor extensão gases, vapor e líquidos, somente alguns são usados para fim científico. [35].

O custo elevado dos adsorventes comerciais comumente empregados para adsorção de poluentes orgânicos conduz à busca por adsorventes alternativos e de baixo custo. Muitos adsorventes não convencionais, a exemplo de polímeros de coordenação, nanotubos de carbonos e, sobretudo os bioadsorventes, têm sido testados e se mostrando bastantes promissores para remoção de poluentes em matrizes aquosas [36,37].

##### *1.4.1- Biocarvão*

Ao longo dos anos, o biocarvão vem se tornando notável na abordagem a favor do meio ambiente, especialmente no que diz respeito a agricultura, em que desempenha um papel importante no sequestro de dióxido de carbono atmosférico, e assim possibilitando a reabilitação dos solos degradados [38,39].

O biocarvão tem se mostrado eficiente para a fertilidade do solo e sustentabilidade, despertando interesse de muitos pesquisadores e agricultores em todo o mundo [40]. O biocarvão é um material rico em carbono, refinado, poroso, que é produzido quando a biomassa (matéria prima biológica) é aquecida a temperaturas entre 300 °C e 1000 °C sob condições limitadas de oxigênio. Desse modo, por apresentar uma superfície

porosa e uma vasta área superficial o biocarvão provou ter uma alta capacidade de retenção de nutrientes e de água no solo [40, 41].

Vários tipos de biomassa podem servir como materiais para a produção do biocarvão. A exemplo de rejeitos de madeira e plantações, esterco animal, resíduos de colheitas e rejeitos industriais, geralmente com altas concentrações de carbono e compostos hemicelulosos. Neste sentido, um dos principais benefícios incorporados ao uso do biocarvão é o de ser produzido a partir de biomassas que podem ser potencialmente prejudiciais ao meio ambiente [41,42].

Além do excelente desempenho no solo, diversos estudos demonstraram que o biocarvão tem uma elevada capacidade de adsorção para uma ampla variedade de contaminantes orgânicos, podendo-se citar os biocarvões provenientes de casca de banana, palha de arroz, bambu, quitosana, bagaço de cana-de-açúcar, serragem de madeira, casca de semente de Moringa oléifera, fibra de coco e casca de laranja [37,38]. A variação de temperatura é um dos principais parâmetros que influenciam a área superficial do material, pois o aumento da temperatura de pirólise ( $<500^{\circ}\text{C}$ ) produz biocarvões com maior área de superfície ( $> 400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) e maior quantidade de grupos aromáticos resultante da decomposição da matéria-prima, o que favorece a adsorção de compostos químicos tais como os agrotóxicos [42,43].

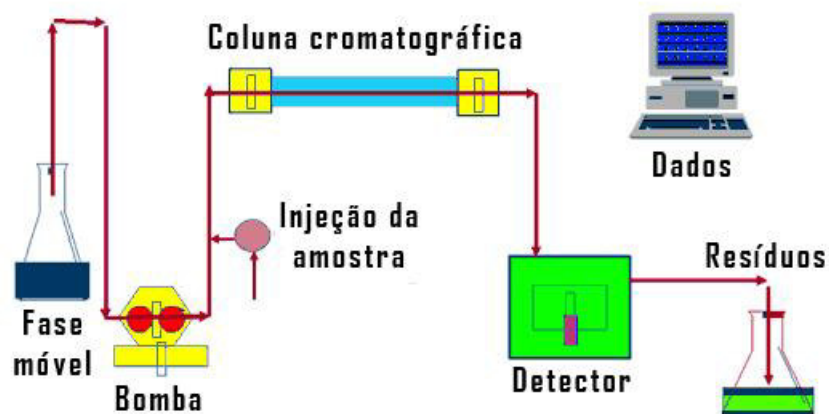
### **1.5- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma importante ferramenta de análise, pois possibilita a separação de misturas que contêm um grande número de compostos e que são termicamente instáveis e/ou não voláteis, os quais não são determinados por cromatografia gasosa, devido às altas temperaturas que esta técnica exige [44].

Os parâmetros analíticos da CLAE devem ser otimizados de forma a possibilitar a separação dos analíticos dos demais compostos da matriz. Dentre

eles pode-se mencionar: fase estacionária (coluna), fase móvel (FM), vazão, eluição e detectores. A Figura 3 esquematiza o processo que ocorre na CLAE.

**Figura 3:** Esquema de cromatografia líquida de alta eficiência. **FONTE:** ISSUFO, 2009 [45].



A **coluna** é considerada uma das partes mais importantes dos sistemas cromatográficos, uma vez que é nela que a separação ocorrerá, a **fase móvel** desempenha um papel importante, pois além de arrastar os componentes da amostra participa do processo de separação dos analitos. A **eluição** é o processo que envolve o transporte de uma espécie através da coluna por adição contínua de novos volumes de solvente, uma vez que os componentes da amostra eluídos da coluna precisam ser detectados para uma possível identificação e quantificação. Os **detectores** são capazes de operar em uma ampla faixa ou intervalos de concentração. Quando possível, devem ser insensíveis à variação de vazão ou de temperatura e compatíveis com eluição por gradiente [33, 44, 46]

A classe de detectores mais usadas na CLAE é a óptica, que engloba os de absorbância, índice de refração, fluorescência e espalhamento de luz [46]. Sendo que detectores baseados na absorção de luz no UV/Vis apresentam uma grande aplicação, pois permite a detecção de uma expressiva quantidade de substâncias com grupos cromóforos, ou seja, moléculas que absorvem radiação (UV- VIS) em um comprimento de onda específico [33].

Entre os detectores espectrofotométricos mais adequados para detecção de resíduos de agrotóxicos estão os equipamentos com detecção por arranjo

de diodos (DAD) que permitem obter um espectro de absorção a cada segundo, gerando informações que indicam a presença dos compostos em um determinado tempo, o que permite checar a identidade do composto e a pureza do pico [10].

## **1.6- Validação do método analítico**

A validação é um processo de avaliação que comprova a eficiência de um método analítico desenvolvido ou a adaptação de um método conhecido em uso rotineiro, para garantir que o método forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra [47,48].

Ribani, 2004 [48], afirma que a validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países recomendam a validação de um método analítico desenvolvido.

A exemplo da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que diz que a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. E o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) define validação como a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos. Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº. 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 de março de 2003 [22, 49].

Para validação de métodos cromatográficos, diferentes parâmetros podem ser avaliados tendo como exemplos: linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho ou como figuras analíticas de mérito [48].



A linearidade visa a definição do intervalo de concentração no qual é possível quantificar de forma segura os analitos. Ela corresponde à capacidade do método em fornecer sinais analíticos diretamente proporcionais à concentração do composto estudado dentro de uma determinada faixa de concentração. Pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta,  $y = ax + b$ , chamada de curva analítica, com a qual é possível calcular o coeficiente de correlação  $r$  ou o coeficiente de determinação  $r^2$ , que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva [22,48,49].

A sensibilidade indica a que nível o método desenvolvido é capaz de diferir com fidelidade concentrações muito próximas. A sensibilidade analítica usualmente também é obtida pela equação da reta, na qual são avaliados os coeficientes angulares, que quanto maior a inclinação maior a sensibilidade do método [48,49].

A precisão representa a concordância dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. E pode ser obtida pela repetibilidade, reprodutibilidade. Para a repetitividade, o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. ANVISA sugere que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado, podendo ser expressa pelo coeficiente de variação. Enquanto que a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. E pode ser avaliado pelos materiais de referência certificados (CRM), comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição padrão [22,48,49].

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) são parâmetros relacionados à capacidade do método desenvolvido em detectar e quantificar analitos em baixas concentrações. O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, podendo ser obtida por diferentes maneiras: método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica. O LQ representa a menor concentração da substância em exame que

pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental [48,49].

### **1.7- Revisão da Literatura**

É possível encontrar na literatura diversos trabalhos relatando a determinação de agrotóxicos em água utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE). No entanto, nenhum deles aborda a determinação dos agrotóxicos fenarimol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol e vinclozolina em água, e apenas um trabalho (Zang et al., 2012 [50]) reporta o uso do biocavão como adsorvente alternativo para a SPE.

Assim, esta revisão descreve alguns estudos que utilizaram a SPE para determinação de agrotóxicos em água fazendo uso de adsorventes comerciais e adsorventes alternativos, apresentados na Tabela 3. Sendo o intuito principal do trabalho, contribuir com a literatura, visto que não existe nenhum relato sobre o uso do biocarvão proveniente de rejeito de coco na determinação de agrotóxicos em água.

Zang et al., 2012 [50], desenvolveram um método utilizando biocarvão proveniente de bagaço de bambu como fase sólida da SPE para determinação dos agrotóxicos malationa, triazófos, eptalofós, fentiona, foxima e profenofós em água. Inicialmente, 1 g do biocarvão foi empacotado no cartucho de extração e submetido a um pré-tratamento, no qual foi submerso um recipiente contendo metanol por 15 minutos e deixado secar em temperatura ambiente por 24 h. O procedimento de extração consistiu em condicionar o cartucho de extração com 5 mL de acetonitrila e 10 mL de água ultrapurificada. Em seguida foi passado 100 mL da amostra de água, lavado com 10 mL de água ultrapurificada, eluido com 10 mL de acetonitrila e analisado por HPLC. O procedimento se mostrou eficiente com recuperações entre 69 – 93%.

H-Sánchez et al., 2013 [51], desenvolveram um método de extração em fase sólida para determinação de 37 agrotóxicos em água, no qual foram utilizados cartuchos de material polimérico HLB. Metanol e acetato de etila foram os solventes utilizados no procedimento de extração. Os agrotóxicos foram analisados por UHPLC/MS a fim de comparar a eficiência da extração

dos agrotóxicos em água por SPE-offline e SPE-online. Ambos os procedimentos foram eficientes, e na SPE-offline as recuperações foram satisfatórias para 35 dos agrotóxicos variando entre 60 – 116%.

Ribeiro et al., 2013 [2], validaram um método empregando extração em fase sólida para a determinação dos agrotóxicos acetamiprido, aldicarbe, carbendazim, carbofurano, clomazona, diurom, epoxiconazol, imidacloprido, metomil, piraclostrobim, tebuconazol, teflubenzurom, lufenurom, clorfluazurom, tiacloprido, tiametoxam e terbutilazina em água de rio utilizando o estireno divinil benzeno (SDVB) como adsorvente alternativo. A água e metanol foram utilizados como solvente para a extração dos analitos que foram analisados por HPLC-UV/DAD. O SDVB se mostrou eficaz para a determinação dos agrotóxicos obtendo recuperações entre 61 – 120%.

Atrache et al., 2013 [52], otimizaram condições experimentais para extração em fase sólida e pré-concentração dos agrotóxicos carbamatos, aminocarbe, baygon, carbofurano, carbaril, clorpirifós, baycarb, metiocarbe e zectran, em amostras de água no qual se fez uso de cartuchos de C<sub>18</sub>, acetonitrila e água como eluente para análise do extrato por LC-ESI-MS. O método se mostrou eficiente com recuperações superiores a 90% para todos os carbamatos.

Bonansea et al., 2013 [53], relataram um método combinando extração em fase sólida, seguida por microextração em fase sólida para concentrar os agrotóxicos atrazina,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e  $\alpha$ -cipermetrina, em amostras de água. Vários tipos de solventes foram avaliados para otimizar o procedimento da SPE, a exemplo de diclorometano, metanol, acetonitrila e água em cartucho contendo C<sub>18</sub> como adsorvente. Em seguida os analitos foram novamente extraídos por SPME e analisados por GC-MS. Recuperações variaram entre 63 – 104%.

Shi et al., 2014 [54], avaliaram um adsorvente alternativo sintetizado em laboratório, grafeno, a fim de extrair seis agrotóxicos carbamatos, pirimicarbe, baygon, carbaril, isoprocarbe, baycarbe e dietofencarbe em amostras de águas superficiais. Para a extração dos analitos foram colocados 30 mg do adsorvente em um cartucho de SPE. O cartucho de SPE foi pré-condicionado com metanol, acetonitrila e água duplamente destilada. Para eluição dos analitos foi utilizado acetona. Em seguida o extrato foi seco e diluído em

acetonitrila para posterior análise em UPLC-MS/MS. Com o adsorvente alternativo foram obtidas recuperações entre 81 – 110 %.

Fernández-Ramos et al., 2014 [55], desenvolveram um método de SPE para a determinação de agrotóxicos das classes dos carbamatos e dos piretróides, aldicarbe, carbaril, pirimicarbe, carbofurano, kadethrin, flumetrina, fenpropatrina, fenoxicarbe, tau-fluvalinato e fenvalerato, em amostras de água de rio, no qual se fez uso de água e acetonitrila para a extração e pré-concentração dos agrotóxicos e foram usados metanol e água para remoção de interferentes da matriz, analisando posteriormente o extrato por HPLC/DAD. As recuperações foram de 98 – 104%.

Satínský et al., 2015 [56], desenvolveram um método SPE para pré-concentração da amostra e determinação dos agrotóxicos fenoxicarbe e cis, trans-permetrina em águas superficiais, no qual utilizou acetonitrila e água como solventes no processo de SPE, analisando o extrato por HPLC/UV. Para a metodologia desenvolvida as recuperações foram superiores a 98%.

A Tabela 3 resume os trabalhos descritos na literatura sobre a determinação de agrotóxicos em água.

**Tabela 3:** Trabalhos descritos na literatura sobre a determinação de agrotóxicos em água utilizando a SPE.

Referência	Matriz	Analitos	Adsorvente	Solvente de eluição	Técnica Instrumental
<b>Zang et al., 2012</b>	Água ultrapurificada	Malationa, Triazófos, Eptalofós, Fentiona, Foxima e Profenofos	Biocarvão de bambu	Acetonitrila	HPLC
<b>H-Sánchez 2013</b>	Água ultrapurificada	37 agrotóxicos	HLB ( Polímero)	Metanol e Acetato de Etila	UHPLC/MS
<b>Ribeiro et al., 2013</b>	Água de rio	Epoxiconazol, e outros 16 agrotóxicos	SDVB (Polímero)	Metanol	HPLC/UV-DAD
<b>Atrache et al., 2013</b>	Água ultrapurificada	Aminocarbe, baygon, carbofurano, carbaril, clorpirifós, baycarb, metiocarbe e zectran	C <sub>18</sub>	Metanol	LC-ESI-MS
<b>Bonansea et al., 2013</b>	Água de rio	Atrazina, $\alpha$ -endosulfan, $\beta$ -endosulfan, e $\alpha$ - cipermetrina	C <sub>18</sub>	Acetonitrila, Diclorometano e Metanol	GC-MS
<b>Shi et al., 2014</b>	Água de rio	Pirimicarbe, baygon, carbaril, isoprocarbe, baycarbe e dietofencarbe	Grafeno (Polímero)	Metanol, Acetona e ACN	LC- MS
<b>Fernández-Ramos et al., 2014</b>	Água de rio	Aldicarbe, carbaril, pirimicarbe, carbofurano, kadethrin, flumetrina, fenpropatrina, fenoxicarbe, tau-fluvalinato e fenvalerato	C <sub>18</sub>	Acetonitrila	HPLC/DAD
<b>Satínský et al., 2015</b>	Água de rio	Fenoxicarbe e cis, trans-permetrina	C <sub>18</sub>	Acetonitrila	HPLC/UV

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Geral**

Desenvolver um método analítico pela utilização de extração em fase sólida empregando biocarvão como adsorvente alternativo, e cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-VIS/DAD para determinação de resíduos em água de agrotóxicos (perturbadores endócrinos) de diferentes classes químicas.

### **2.2- Específicos**

- Selecionar os agrotóxicos.
- Otimizar as condições cromatográficas de análise dos agrotóxicos selecionados por HPLC UV-Vis/DAD.
- Avaliar a eficiência dos adsorventes comerciais: Alumina neutra, Sílica gel, Florisil e C<sub>18</sub> para extração dos agrotóxicos.
- Desenvolver um método analítico rápido, seletivo e sensível para determinação de resíduos dos agrotóxicos selecionados (epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol, e vinclozolina), em água a partir da técnica de extração em fase sólida.
- Otimizar os parâmetros da SPE, utilizando o biocarvão como adsorvente.
- Comparar a eficiência dos adsorventes comerciais com os adsorventes alternativos, biocarvão de coco, laranja, goiaba e aguapé na extração de agrotóxicos em água.
- Caracterizar os biocarvões avaliados utilizando as técnicas de análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e adsorção de N<sub>2</sub> (BET).
- Validar o método desenvolvido
- Aplicar o método proposto em amostras de água do açude da Marcela no município de Itabaina-Se.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1- Materiais**

Balão volumétrico (1; 5, 25, 100, 250 mL), béquer (10, 50, 100, 250 mL), balão de fundo redondo (50 mL), vial (1; 5; 40 mL), seringa de vidro (5 mL), micropipetas de volumes variável 100-1000 µL (Tedia Brasil, modelo TediaPet), pipeta Pasteur, vidro de relógio, bastão de vidro, bureta, pinça, almofariz, pistilo, espátula e filtro de seringa (0,45 µm – Nylon).

#### **3.2- Reagentes e padrões de agrotóxicos**

Foram utilizados padrões certificados dos agrotóxicos Epoxiconazol (Fluka, Suíça, pureza 99,0%); Fenarimol (Chem Service, Itália, pureza 99,3%); Fenbuconazol (Fluka, Suíça, pureza 99,6%); Flusilazol (Fluka, Suíça, pureza 99,8%); Flutriafol (Fluka, Suíça, pureza 97,0%); Vinclozolina (Fluka, Suíça, pureza 99,6%).

Acetonitrila e metanol grau HPLC foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA); água ultrapurificada Milli-Q (Millipore Corporation); acetona grau PA (Hexis Científica S.A, SP, Brasil); alumina neutra (Vetec, RJ, Brasil), sílica (70-230 Mesh; Sílica Flash G60, Silicycle, Quebec, Canadá), Cartuchos SPE Strata FL-PR Florisil (170 µm, 80 Å) 500 mg/ 6 mL (Phenomenex, EUA); Cartucho SPE Strata C18-E (55 µm, 70 Å), 500 mg/ 6mL (Phenomenex, EUA).

#### **3.3- Equipamentos**

Balança analítica (Sartorius TE214S); evaporador rotatório (Fisatom 802D); banho ultrassônico de marca Unique (USC - 1400 / Família USC-1400A / USC-1450<sup>a</sup>), sistema para SPE Vacuum Manifold (Varian, Walnut Creek, CA, EUA); forno rotativo especial (FRO - 1100) de fluxo contínuo da empresa FORTELAB - Indústrias de forno elétrico Ltda; forno de marca EDG, modelo

(FTHV-20 10P) BI-PARTIDO, nº de série 18/9572; cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos; coluna analítica HS C<sub>18</sub> 3 µm (150 x 4,6 mm, Sigma Aldrich); coluna analítica Kinetex C<sub>18</sub> 2,6 µm (150 x 4,6 mm, Phenomenex); coluna analítica Luna C<sub>18</sub> 2,5 µm (100 x 3 mm, Phenomenex); coluna analítica Synergi RP-80 Å C<sub>18</sub> 4 µm (250 x 4,6 mm, Phenomenex) com coluna de guarda; Forno de Coluna da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence CTO-20A com faixa de controle de temperatura de 10 °C a 85 °C.

### **3.4- Preparo das soluções padrão**

As soluções estoque dos agrotóxicos foram preparadas, individualmente, pesando massas de aproximadamente 0,0250 g dos padrões de agrotóxicos e solubilizadas em 25 mL de acetonitrila, obtendo-se concentrações de 1000 µg mL<sup>-1</sup> dos agrotóxicos epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, flutriafol, e vinclozolina. As soluções padrão estoque foram armazenadas em vials de 40 mL em freezer, a fim de evitar degradação e evaporação do solvente. Em seguida, foram preparadas soluções individuais de trabalho e mix dos padrões utilizados em diferentes concentrações (100; 25; 10; 5 e 1 µg mL<sup>-1</sup>).

### **3.5- Obtenção do biocarvão**

#### *3.5.1- Biomassa de rejeitos de goiaba*

Resíduos de goiaba foram cedidos pela empresa Pomar do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda., indústria produtora de polpas localizada no distrito industrial na cidade de Aracaju-Se. Após coleta, o material foi deixado em estufa a 100°C por 24h e armazenado. A pirólise foi realizada em um forno rotativo de fluxo contínuo, e as condições são apresentadas na Tabela 4.



**Tabela 4:** Condições experimentais para produção do biocarvão de rejeitos goiaba em forno rotativo FRO - 1100.

Parâmetro	Valor
Temperatura (°C)	350
Tempo (min)	30
Fluxo N <sub>2</sub> (L min <sup>-1</sup> )	4
Vibração do Alimentador	90
Rotação do Alimentador	Baixo
Inversor	23
Inclinação do forno (cm)	6
Temperatura do banho para o condensador (°C)	2,1

A segunda etapa do processo consistiu em diminuir o tamanho das partículas do biocarvão utilizando um moinho de facas com uma peneira de 10 Mesh, cedido pelo Prof. Dr. Paulo César Nogueira, do laboratório Laborganics, no Departamento de Química, da Universidade Federal de Sergipe.

Por fim, foram utilizados almofariz e pistilo para obter partículas visivelmente semelhantes as dos adsorventes comerciais utilizados no desenvolvimento do trabalho.

### 3.5.2- Biomassa da planta Aguapé (*Eichhornia crassipes*)

Amostras de aguapé foram coletadas no Açude da Marcela, situado no Município de Itabaina-SE, e deixadas secar durante uma semana a temperatura ambiente. Em seguida o material seco, foi moído de facas com uma peneira de 10 Mesh no laboratório de remediação de solos, situado no Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe, e submetido a um processo de pirólise em um forno rotativo de fluxo contínuo, e as condições são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5:** Condições experimentais para produção do biocarvão de aguapé em forno rotativo FRO - 1100.

Parâmetro	Valor
Temperatura (°C)	500
Tempo (min)	30
Fluxo N <sub>2</sub> (L min <sup>-1</sup> )	4
Vibração do Alimentador	90
Rotação do Alimentador	Baixo
Inversor	23
Inclinação do forno (cm)	4
Temperatura do banho para o condensador (°C)	2,1

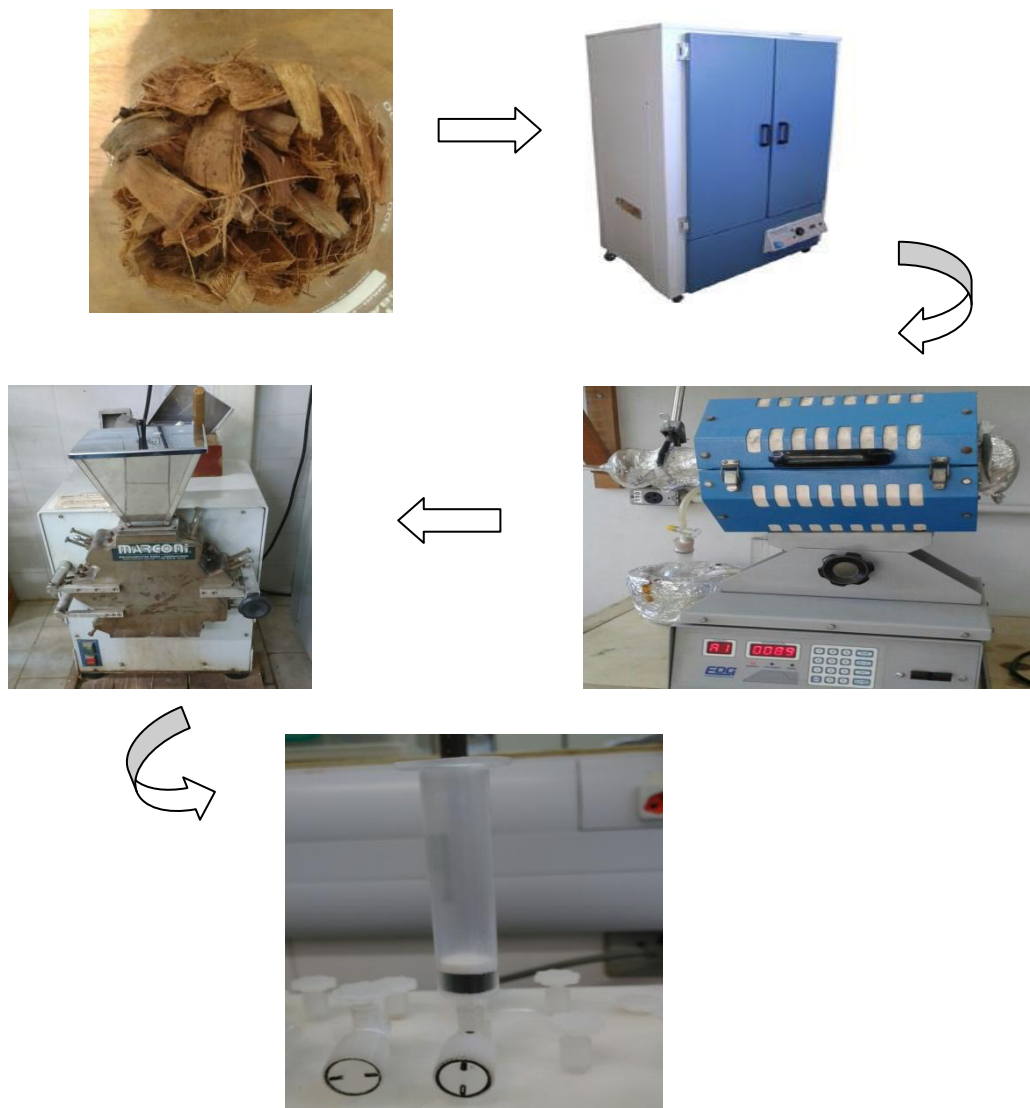
Após a obtenção, o biocarvão foi lavado em filtragem com água destilada corrente e por fim foi seco em estufa por 24 horas.

Os parâmetros apresentados nas Tabelas 4 e 5 foram obtidos pelo Grupo de Pesquisa PEB, coordenado pelo Prof. Dr. Alberto Wisniewski Jr do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), Departamento de Química, da Universidade Federal de Sergipe.

### 3.5.3- Biomassa de rejeitos de coco e laranja

Foram coletados resíduos do coco e laranja nas lanchonetes da Universidade Federal do Paraná. Em seguida foi separado o mesocarpo do coco e deixado secar em estufa a 105° C por 24 horas, assim como as cascas da laranja. Posteriormente as biomassas foram submetidas a um processo de pirólise em um forno de marca EDG, iniciando em temperatura ambiente até uma temperatura de 450°C e com taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> no Laboratório de Processos e Projetos Ambientais da Universidade Federal do Paraná (LABPPAM). Por fim, o material pirolisado foi submetido a um moinho de facas com peneira de 10 Mesh. O esquema para obtenção do biocarvão de coco pode ser observado na Figura 4.

**Figura 4:** Processo de obtenção do biocarvão de coco.



### 3.6- Caracterização dos biocarvões

A análise elementar dos materiais foi feita em um equipamento da marca LECO, modelo CHN628, e os resultados tratados no software CHN628 versão 1.30. O equipamento foi operado com hélio (99,995%) e oxigênio (99,99%) com temperatura da fornalha a 950 °C e temperatura de incinerador a 850 °C. O equipamento foi calibrado com um padrão de EDTA (41,0% C; 5,5% H e 9,5% N) usando massa na faixa entre 10-200 mg. O padrão e as amostras foram analisados utilizando 100 mg das amostras em papel alumínio.

Os espectros de transmitância por transformada de Fourier (FTIR) obtidos na região do infravermelho com foram registrados em espectrofotômetro Bio-Rad, Excalibur Series FTS 3500 GX, utilizando-se pastilhas de KBr ( $\pm 1$  mg de biocarvão/99 mg de KBr). Para cada espectro foram acumuladas 32 varreduras com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  na região de 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

A morfologia da superfície das amostras foi estudada utilizando o sistema de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (TM 3000/ Hitachi), operando a 15 kV, a alto vácuo com corrente de emissão de 29500 nA e corrente de filamento de 1850 nA.

A técnica de adsorção de nitrogênio a 77 K foi utilizada para determinar as áreas superficiais específicas através do equipamento de marca Quantachrome, modelo NOVA 1200, utilizando o método BET desenvolvido por Brunauer-Emmett-Teller. Antes da análise a amostra de biocarvão do resíduo da goiaba passou por um processo de de-gaseificação na temperatura de  $150^{\circ}\text{C}$  por um período de 2 h.

As análises para caracterização do biocarvões foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Instrumentação I/NPGQ, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Sergipe.

### **3.7- Procedimentos de limpeza do biocarvão de coco**

#### *3.7.1- Lavagem com metanol*

Em um béquer de 250 mL contendo metanol grau HPLC, foram mergulhados os cartuchos empacotados com 0,5g do biocarvão de coco e deixados submersos por 15 minutos no solvente, em seguida os cartuchos foram deixados secar a temperatura ambiente por 2 h.

#### *3.7.2- Lavagem com água deionizada*

Em um béquer de 250 mL, foram adicionados 10 g do biocarvão de coco com suspensão de 200 mL de água deionizada e agitando-se com o auxílio de

um bastão de vidro. Em seguida, a solução foi filtrada em funil de Buchner. O procedimento foi repetido até que a coloração da água fosse mais clara que a inicial, foram utilizados aproximadamente 3 L de água deionizada.

### *3.7.3- Ultrassom*

Em um tubo Falcon foi adicionado 0,5 g do biocarvão de coco e 5 mL de acetonitrila. A solução foi submetida a agitação em um banho ultrassônico por 5 minutos. Em seguida o adsorvente foi filtrado em um funil de Buchner e seco em estufa a 100° C por 24 h.

## **3.8- Procedimento de extração dos agrotóxicos por SPE**

No sistema para SPE, com o fluxo de aproximadamente 1 mL min<sup>-1</sup>, o cartucho foi previamente condicionado com a adição de 3 mL de acetonitrila e 6 mL de água ultrapurificada. Em seguida foi feita a percolação de 50 mL de uma solução de agrotóxicos em água ultrapurificada em diferentes níveis de fortificação. Logo depois, foram aguardados 5 minutos para a secagem do cartucho. Os analitos foram eluídos com 5 mL de acetonitrila, coletando o eluato em um balão de fundo redondo. O eluato foi concentrado em evaporador-rotatório (60°C e 100 rpm) até cerca de 1 mL. O volume do extrato foi ajustado em um balão volumétrico de 1 mL. O extrato foi filtrado em membrana de 0,45 µm e analisado por HPLC-UV/DAD.

## **3.9- Condições operacionais do sistema cromatográfico para análise dos agrotóxicos**

As condições cromatográficas de análise foram otimizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence composto por: desgaseificador DGU-20A<sub>3</sub>, sistema

binário de bombas LC-20AD, módulo de comunicação CBM-20A, auto injetor SIL-20A HT e detector espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A. A coluna analítica utilizada para separação dos analitos foi a Synergi C<sub>18</sub> 4u Polar-RP 80 Å (250 x 4,6 mm, 4µm, Phenomenex) com coluna de guarda constituída da mesma fase estacionária da coluna. O software de gerenciamento foi o LCSolution.

As condições ótimas de análise cromatográfica foram: volume de injeção de 20 µL, fluxo da fase móvel 0,8 mL min<sup>-1</sup>, eluição em um modo gradiente com fase móvel composta pela mistura Acetonitrila:Água (a programação da fase móvel utilizada no processo de separação dos analitos está listada na Tabela 6) com tempo total de corrida de 35 minutos. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda 207 nm.

**Tabela 6:** Programação da fase móvel ACN/H<sub>2</sub>O.

<b>Tempo (min)</b>	<b>ACN (%)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (%)</b>
0,01	50	50
8	50	50
25	65	35
35	50	50

### 3.10- Aplicação em amostra real

As amostras de água foram coletadas no Açude da Marcela no mês de janeiro do presente ano. Para realização da coleta das amostras foram selecionados dois diferentes pontos. O primeiro, às margens do açude bem próximo as plantações de hortaliças. O segundo, em um reservatório onde eram lavadas as hortaliças cultivadas no local. As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro e transportadas em condições refrigeradas. No laboratório, ambas amostras foram armazenadas sob uma temperatura de 4 °C até o dia das análises.

### **3.11- Limpeza da vidraria**

A lavagem da vidraria segue um procedimento padrão do laboratório:

- Enxágue com água corrente, por duas vezes;
- Lavagem com solução detergente neutro 20%,
- Enxágue da solução detergente com água corrente até a completa retirada,
- Lavagem com água destilada,
- Enxágue com acetona,
- Secagem em estufa a 100°C

### **3.12- Descartes dos reagentes**

Os solventes orgânicos utilizados no procedimento experimental foram armazenados em bombonas de polietileno de 50 L. As soluções de agrotóxicos foram armazenadas em frascos de vidro e os resíduos sólidos foram descartados em bombonas de polietileno devidamente identificadas para disposição final por empresas especializada.

## **4- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A princípio, para o desenvolvimento do método analítico, foram otimizadas as condições cromatográficas empregando a técnica de HPLC UV-VIS/DAD para determinação dos agrotóxicos selecionados. Posteriormente, fazendo o uso da técnica de extração em fase sólida (SPE) foram realizados procedimentos em bancada para otimização da metodologia de preparo de amostra. Logo após, otimizou-se os parâmetros da SPE utilizando biocarvão como adsorvente. Em seguida, foram avaliadas as figuras de mérito para a validação do método analítico proposto. Por fim, o método foi aplicado em matrizes reais em amostras de água do Açude da Marcela.

### **4.1- Otimização das condições cromatográficas de análise**

As soluções de trabalho em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram injetadas individualmente no HPLC Shimadzu com detector UV-Vis/DAD em modo exploratório de eluição.

O modo exploratório de análise em cromatografia líquida consiste em variar da menor a maior proporção do solvente orgânico da fase móvel do sistema cromatográfico, sendo de 5 - 100%, em um tempo total de corrida de 60 minutos, para então conhecer a proporção de solvente orgânico que é necessário para que o analito seja eluído pela coluna [57].

O método de análise exploratória é uma ferramenta comumente utilizada no desenvolvimento de um método de separação, pois é capaz de fornecer ao analista informações relacionadas ao comportamento dos analitos. Permitindo o conhecimento de dados como grau de afinidade com as fases estacionária e móvel, tempo de retenção, e possíveis coeluições, informações de suma importância para elaboração do método de eluição, seja ele isocrático ou gradiente, ocasionando em uma redução de número de experimentos e, consequentemente redução de custos operacionais [57].

Outra informação importante que se pôde verificar através da primeira análise dos agrotóxicos foi o comprimento de onda em que os compostos

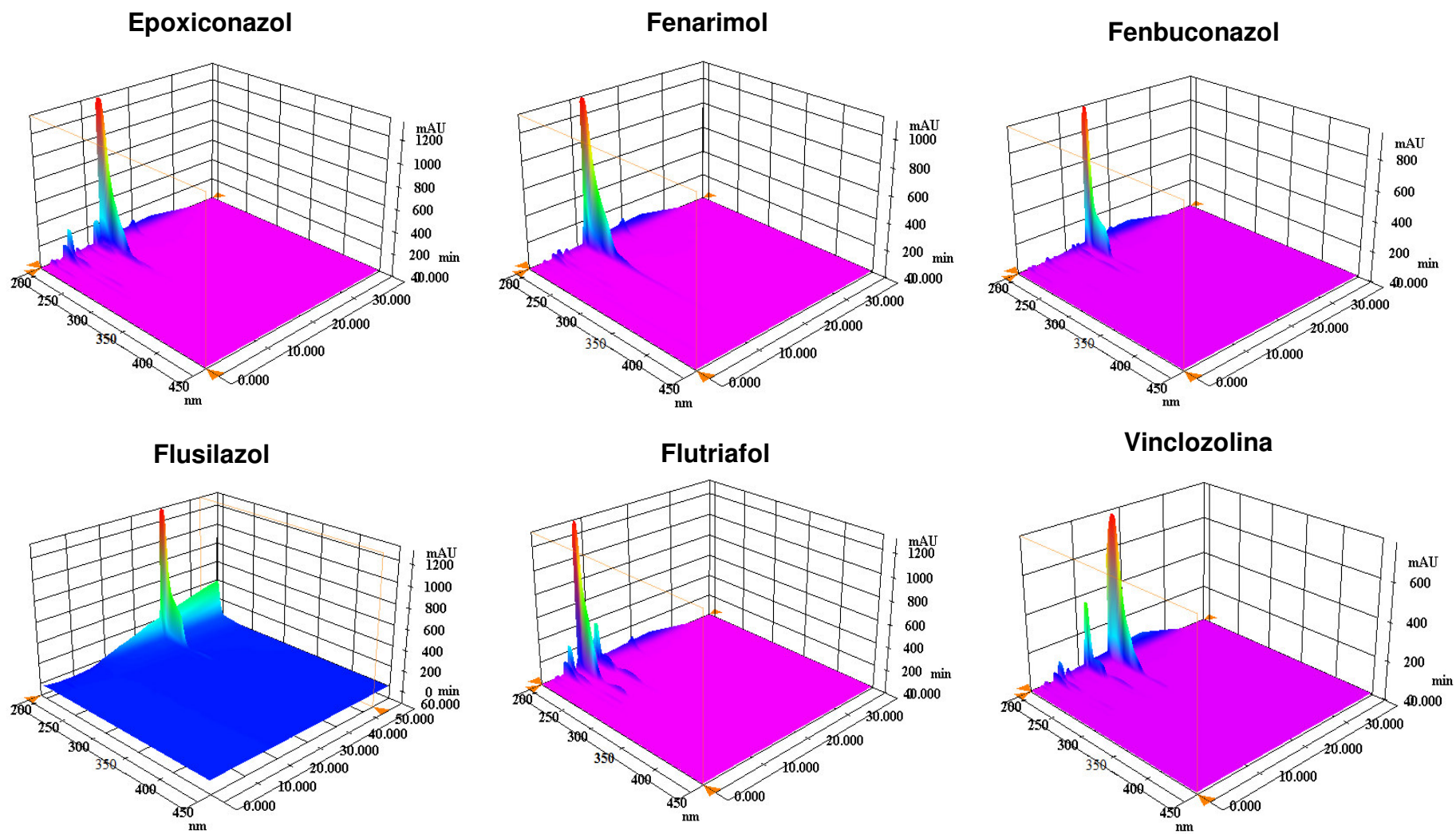


melhor absorveram a radiação (UV-VIS). Uma vez que o funcionamento do detector por arranjo de diodos baseia-se na absorção de luz por parte da amostra ao passar através dela uma radiação eletromagnética de comprimentos de onda variável entre o UV-VIS, cobrindo a faixa de 190-800 nm, através de monocromador que seleciona o comprimento de onda desejado do feixe de luz emitido pelas lâmpadas de deutério (UV) ou tungstênio (VIS) [44].

Sendo uma das principais vantagens de se trabalhar com o detector de arranjo de diodos essa possibilidade de fazer uma varredura espectral de cada pico cromatográfico referente aos padrões de agrotóxicos. A obtenção de um espectro de cada substância separada permite a verificação de dados com a região de maior absorção do composto, além da sua pureza, indicando a eficiência da separação [58]

A Figura 5 apresenta os espectros de absorção dos agrotóxicos epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol, vinclozolina.

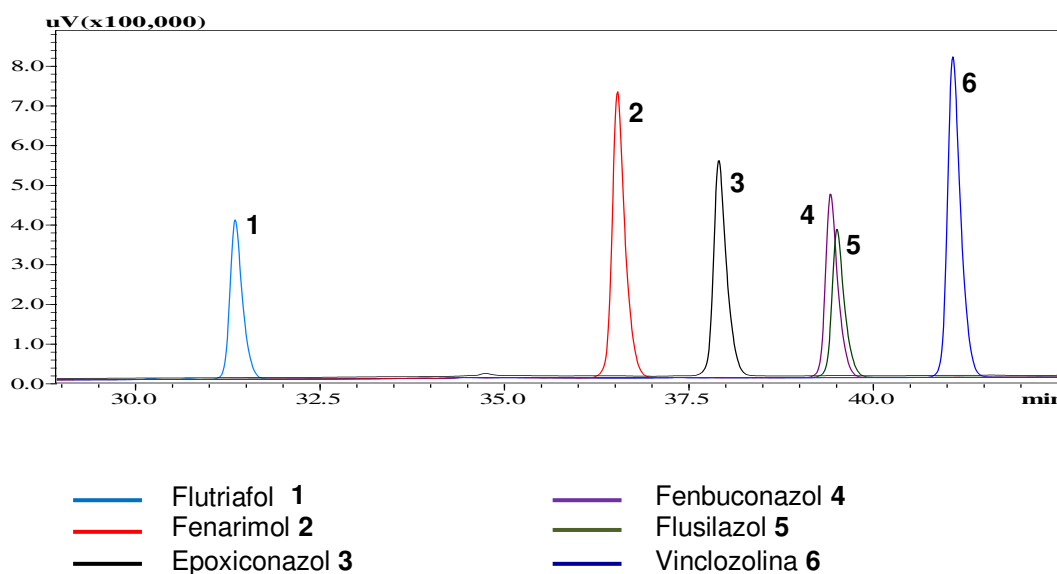
**Figura 5:** Espectros de absorção dos agrotóxicos.



Conforme a Figura 5 é possível verificar que o detector por arranjo de diodos se mostrou eficiente para análises dos agrotóxicos epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol, vinclozolina, uma vez que com a radiação UV-VIS incidida sobre as moléculas, a região constituída por grupos cromóforos foi excitada emitindo espectros com bandas intensas e definidas em comprimentos de ondas próximos a 200 nm. Selecionando um comprimento de onda de 207 nm para as análises posteriores.

Por meio das análises individuais em modo exploratório foi verificado que os analitos responderam bem as condições cromatográficas de análise, e que os padrões fenbuconazol e flusilazol apresentaram tempos de retenção próximos, o que possivelmente resultaria em uma coeluição dos analitos, Figura 6.

**Figura 6:** Sobreposição dos cromatogramas das soluções padrão dos agrotóxicos analisados individualmente em  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  por HPLC UV-Vis/DAD. Para condições de análise ver a Tabela A no apêndice.



Sabendo-se que diversos são os fatores que influenciam no processo de separação em cromatografia líquida, a exemplo da composição da fase móvel e da fase estacionária, velocidade da fase móvel e temperatura do forno da coluna analítica [59], foram realizados testes variando esses parâmetros a fim de obter melhor separação dos analitos.

#### 4.1.1- Testes da composição da fase estacionária

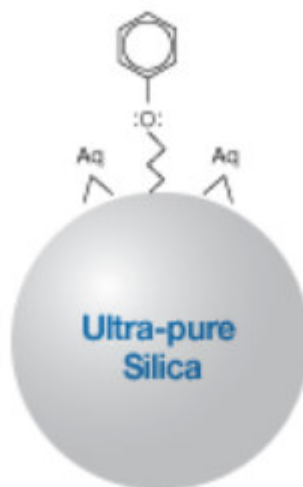
Foram avaliadas quatro colunas cromatográficas com C<sub>18</sub> em sua composição, para obter uma separação dos analitos, cujas especificações são descritas na Tabela 7.

**Tabela 7:** Especificações das colunas utilizadas.

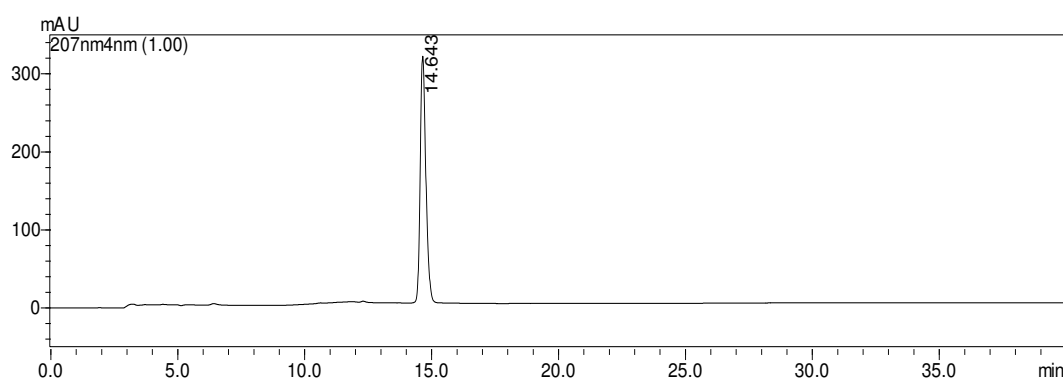
Ordem de Uso	Coluna (Fabricante)	Diâmetro dos poros (Å)	Tamanho de partículas (µm)	Dimensões da Coluna (mm)
1º	<b>Synergi RP-80 Å</b> (Phenomenex)	80	4	250 x 4,6
2º	<b>Kinetex</b> (Phenomenex)	100	2,6	150 x 4,6
3º	<b>Luna</b> (Phenomenex)	100	2,5	100 x 3,0
4º	<b>HS</b> (Sigma Aldrich)	120	3	150 x 4,6

No primeiro momento, foi preparada uma solução dos analitos que possuíam tempos de retenção próximos, fenbuconazol e flusilazol, em concentração de 25 µg mL<sup>-1</sup> e foi analisada utilizando a coluna Synergi RP-80 Å, uma coluna de fase C<sub>18</sub> que apresenta um grupo fenil ligado ao grupo éter de uma cadeia alquila quimicamente ligada à superfície da sílica, como mostra a Figura 7 [60]. A análise pode ser observada na Figura 8. As condições de análise são apresentadas na Tabela A no apêndice.

**Figura 7:** Estrutura química da coluna Synergi RP-80 Å. **FONTE:** PHENOMENEX, 2015.



**Figura 8:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver Tabela A no apêndice.

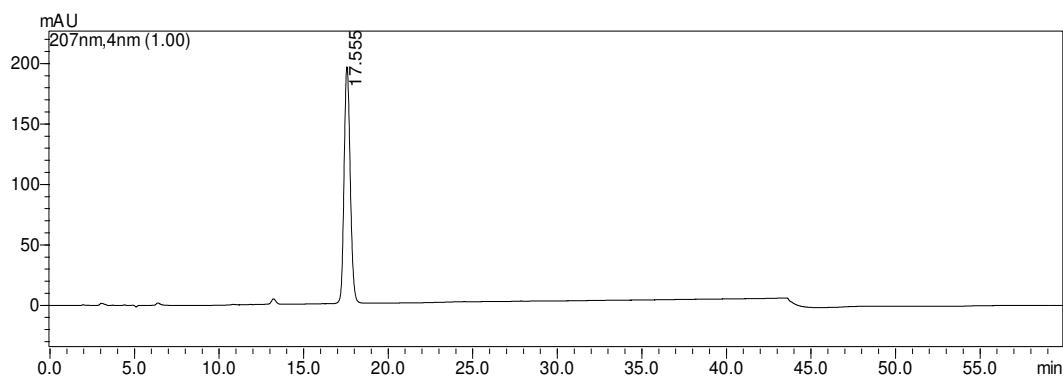


Na Figura 8 foi constatado que houve coeluição dos padrões fenbuconazol e flusilazol, apresentando um pico bem definido e simétrico, parecendo ser referente a apenas um analito. Em seguida, foram testados diferentes gradientes de eluição, em que foi alterado a proporção dos solventes da fase móvel visando a separação dos analitos.

Um dos testes com variação do gradiente de eluição pode ser visualizado na Figura 9, no qual se fez uso de um gradiente na proporção do solvente em que os padrões foram eluídos. No entanto, não foram obtidos resultados satisfatórios, podendo se observar que a única diferença entre as

análises da Figura 8 e 9 foi o tempo de retenção em que os padrões foram registrados.

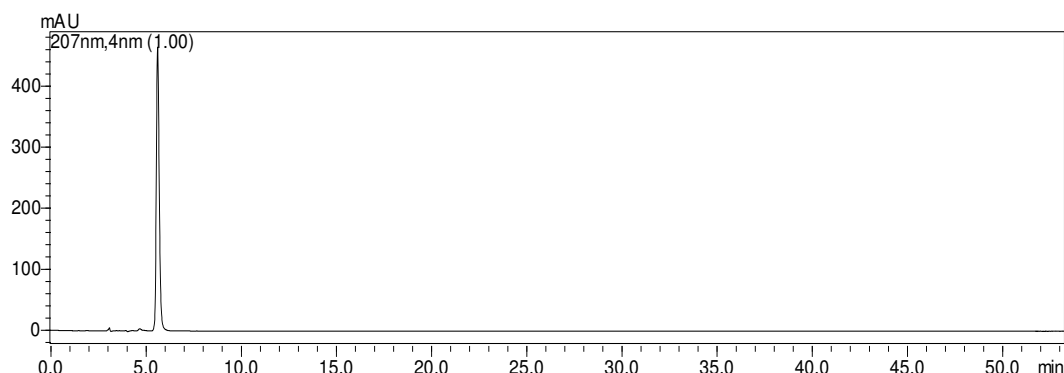
**Figura 9:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela A no apêndice.



Não atingindo sucesso com as análises em modo gradiente, foi testado com a mesma fase estacionária, o modo isocrático de eluição, no qual a composição química da fase móvel não é alterada ao decorrer da corrida cromatográfica [33]. Além da modificação no modo de eluição na análise apresenta na Figura 8, também foi avaliado a variação de temperatura do forno da coluna, aumentando de 30 para 40 °C, o que tem como principal vantagem a redução no tempo de análise, por diminuir a viscosidade da fase móvel, fazendo com que percorra a coluna cromatográfica em um menor tempo, característica que é de grande interesse prático para os usuários de cromatografia, uma vez que, a redução do tempo da corrida cromatográfica ocasiona em um menor custo com solventes orgânicos [61].

No entanto, nota-se que as mudanças não foram suficientes para se obter a separação dos analitos, resultando apenas em uma análise cromatográfica mais rápida que as anteriores. Como pode-se observar a Figura 10.

**Figura 10:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol e, concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela A no apêndice.



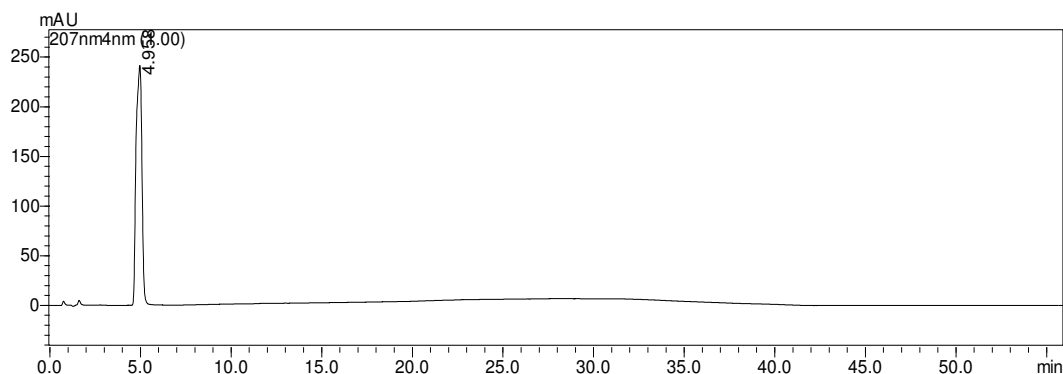
Avaliou-se a eficiência de uma segunda fase estacionária para separação dos padrões fenbuconazol e flusilazol, a Luna-100 Å. Uma coluna também composta de  $C_{18}$  que reveste a superfície da sílica em uma posição terminal de modo que, praticamente todas as interações dos grupos silanóis são eliminadas, caracterizando como uma fase com a polaridade menor que a Synergi RP-80 Å [60].

A Luna-100 Å é uma coluna com tamanho de partícula menor que a Synergi RP-80Å. E o tamanho da partícula é importante em CLAE, porque controla o processo de difusão das moléculas da amostra ao penetrar e sair dos poros da partícula. Quanto maior o tamanho da partícula porosa, mais lento será o processo de difusão e, como consequência, mais lenta será a transferência de massas do analito entre a fase estacionária e a fase móvel. Isto acontece porque, à medida que aumenta o tamanho da partícula, aumenta também a profundidade dos poros; consequentemente, os componentes da amostra demoram mais tempo para sair desses poros profundos. Conforme diminui o tamanho da partícula, a profundidade dos poros diminui também, e a saída das moléculas da amostra dos poros ocorre mais rapidamente, permitindo a obtenção de análises rápidas sem perda de eficiência [45].

Observando a Figura 11, em que se fez uso de um gradiente similar ao da Figura 9, foi verificado que os analitos foram eluídos mais rapidamente quando se comparado a análise realizada com a Synergi RP-80 Å, o que seria

bastante relevante por diminuir o gasto do solvente orgânico para cada análise. No entanto, não se obteve a separação dos padrões fenbuconazol e flusilazol, e então foi avaliada outra fase estacionária.

**Figura 11:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela B no apêndice.



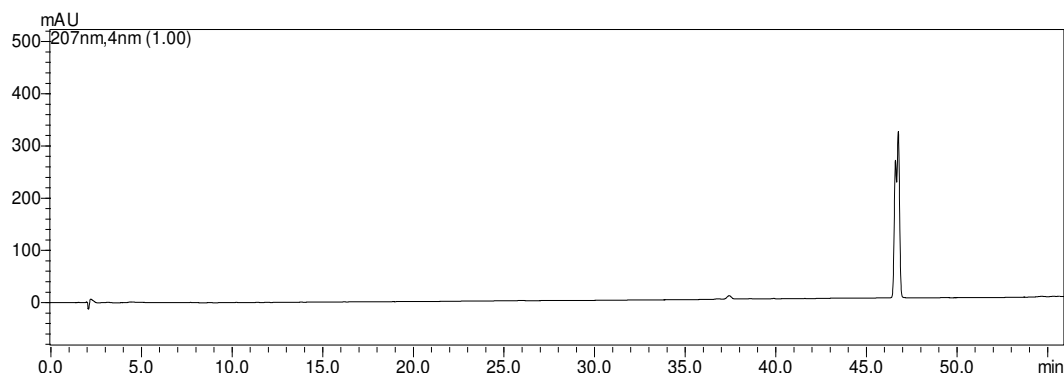
Quando se fez uso da coluna Luna-100 Å a pressão do sistema cromatográfico chegou próximo ao seu limite de trabalho ( $200 \text{ Kg/cm}^2$ ). Uma vez que, quanto menor o tamanho de partícula da fase estacionária maior a pressão gerada pelo sistema. Outro fator que influencia o aumento desta pressão é a o aumento da proporção de água da fase móvel. Desta forma, os gradientes de eluição utilizados para se trabalhar com a Luna-100 Å, iniciaram com uma proporção mínima de 50% do solvente orgânico.

Em seguida, foi analisada a eficiência da coluna Kinetex-100 Å, uma fase com tamanho de partícula próximo a Luna-100 Å, no entanto, quando se utilizou a Kinetex-100 Å foi possível baixar completamente a porcentagem do solvente orgânico sem exceder a pressão limite do sistema, iniciando as corridas cromatográficas em 5% de acetonitrila.

Com a Kinetex-100 Å foram testados diferentes gradientes de eluição. No entanto, não foi possível separar os compostos, como mostra a Figura 12.



**Figura 12:** Cromatograma obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela C no apêndice.

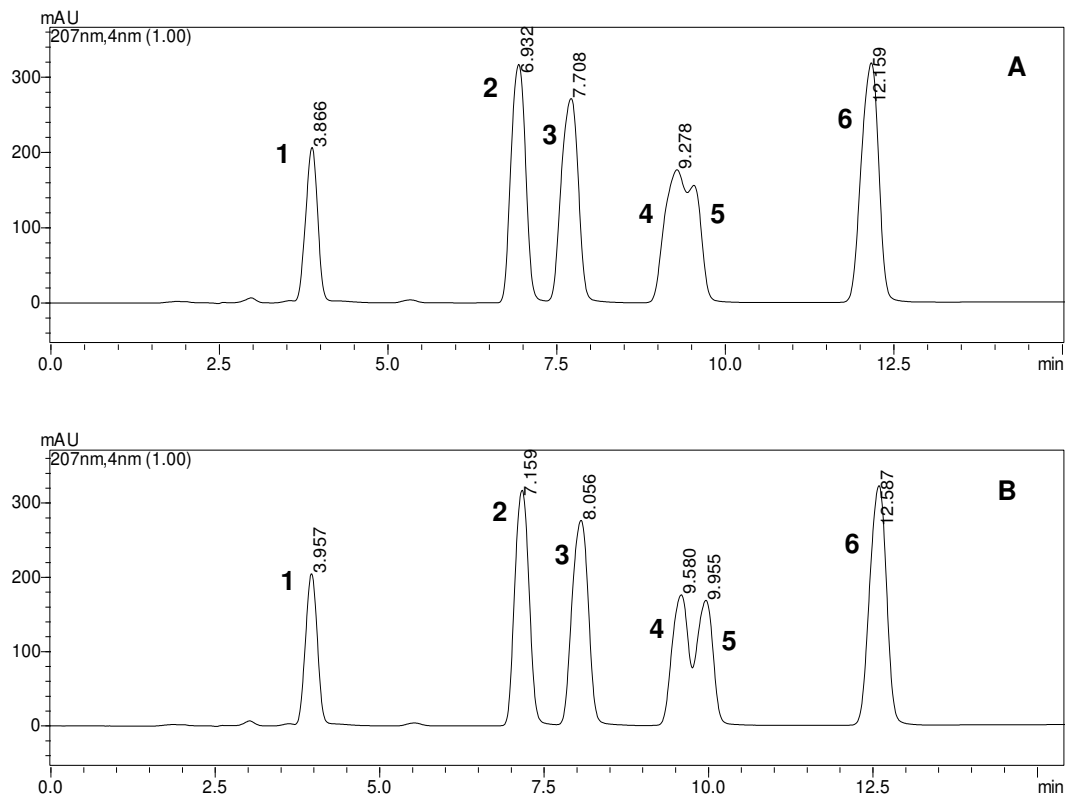


A última fase estacionária para obter a separação dos padrões fenbuconazol e flusilazol foi a HS-120 Å, constituída de  $\text{C}_{18}$ , com um maior conteúdo orgânico que é capaz de reter 10% a mais de uma coluna de  $\text{C}_{18}$  comum [62].

A fase HS-120 Å associada aos gradientes de eluição permitiu uma discreta separação dos padrões fenbuconazol e flusilazol. Em tal caso, foi utilizada a solução dos 6 padrões de agrotóxicos com a intenção de testar sua eficiência na separação dos demais analitos

Os cromatogramas com as análises mais satisfatórias fazendo uso da coluna HS-120 Å são apresentados na Figura 13, sendo possível observar o início da separação dos dois padrões e podendo observar também a influência da temperatura na separação dos analitos, pois na Figura 13 (A) a análise foi realizada com a temperatura do forno da coluna a  $35^\circ\text{C}$ . Enquanto que na Figura 13 (B) a temperatura foi diminuída para  $30^\circ\text{C}$ , aumentando a viscosidade do solvente orgânico, acarretando em uma passagem mais lenta dos analitos pela coluna, melhorando assim a separação dos analitos.

**Figura 13:** Cromatogramas obtido por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução mix dos padrões selecionados em concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela C no apêndice. **(A)**  $35^\circ\text{C}$ ; **(B)**  $30^\circ\text{C}$ .



1- Flutriafol, 2- Fenarimol, 3- Epoxiconazol, 4- Fenbuconazol, 5- Flusilazol, 6- Vinclozolina.

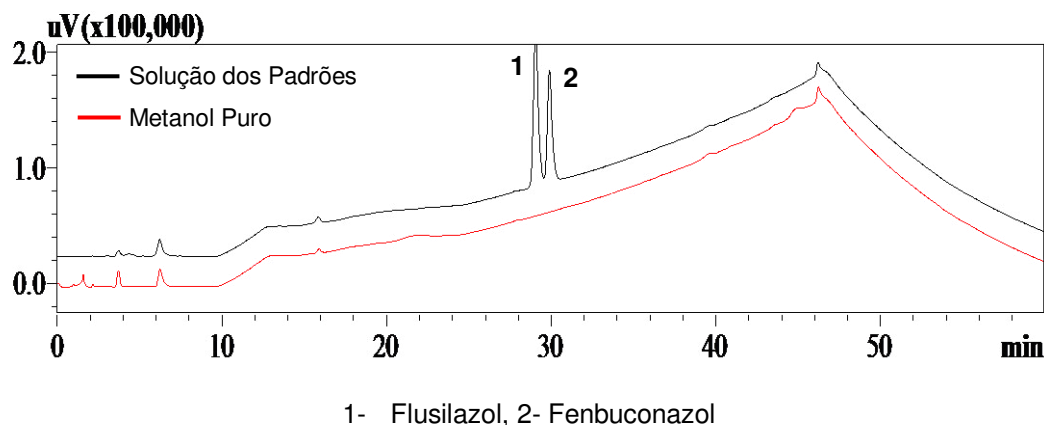
Com a separação obtida na Figura 13 **(B)**, foram testados outros gradientes de eluição na mesma temperatura para torna-se viável o uso da HS-120 Å para o trabalho. No entanto, a condição **B** da Figura 13 foi a melhor encontrada para trabalhar com esse conjunto de analitos, não sendo satisfatória para a posterior quantificação dos padrões fenbuconazol e flusilazol. Assim, optou-se por dar continuidade às otimizações das condições cromatográficas de análise utilizando a primeira fase avaliada, a Synergi RP-80 Å, visto que a mesma apresentou bons resultados e já se encontrava em uso pelo grupo de pesquisa.

#### 4.1.2- Testes da composição da fase móvel

Outro parâmetro que influencia no processo de separação dos analitos é a composição da fase móvel do sistema cromatográfico. Logo, com o objetivo de separar os padrões fenbuconazol e flusilazol, a fase móvel constituída de acetonitrila/água foi substituída por metanol/água, utilizando a Synergi RP-80 Á como fase estacionária do sistema. Mesmo sabendo que o uso da acetonitrila como solvente orgânico em CLAE gera menor pressão e possibilita uma melhor resposta com detector UV a baixos comprimentos de onda. Por outro lado não há nenhuma restrição no uso de fase móvel contendo alcoóis quando a detecção é realizada a mais de 220 nm com o detector UV. Além disso, a pressão do sistema pode ser diminuída pelo aumento da temperatura [61].

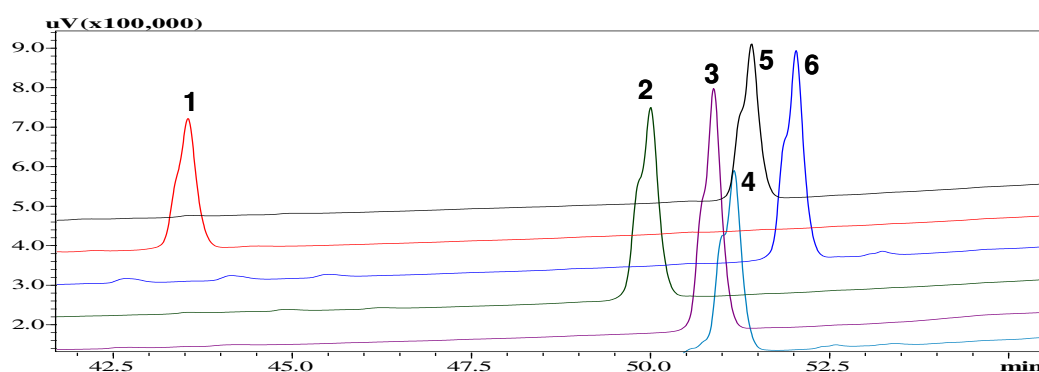
Então, considerando a hipótese de se alterar o comprimento de 207 para 220 nm, foram realizadas análises com a solução dos padrões fenbuconazol e flusilazol, podendo-se observar uma melhor separação dos analitos, como mostra a Figura 13. No entanto, não foi uma análise satisfatória, pois foi possível observar uma linha de base desfavorável, uma vez que o metanol absorve em um comprimento de onda próximo ao selecionado para as análises [62].

**Figura 14:** Sobreposição dos cromatogramas das análises do metanol puro e da solução fenbuconazol e flusilazol em  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  por HPLC UV-Vis/DAD. Para condições de análise ver a Tabela D no apêndice.



Ainda que se conhecessem os inconvenientes por se trabalhar com o metanol em baixo comprimento de onda, foram analisados os seis padrões em modo exploratório, a fim de conhecer o perfil cromatográfico de cada um deles como mostra a Figura 15.

**Figura 15:** Sobreposição dos cromatogramas das soluções padrão dos agrotóxicos analisados individualmente em  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  por HPLC UV-VIS/DAD. Ver condições de análise na Tabela D em apêndice.



1- Flutriafol, 2- Epoxiconazol, 3-Flusilazol, 4- Vinclozolina, 5- Fenbuconazol, 6- Fenarimol

Foi observado, de acordo com Figura 15, que os picos obtidos com as análises exploratórias são poucos simétricos e definidos, visto que os analitos estavam solubilizados em acetonitrila, solvente diferente da composição da fase móvel. Além disso, a separação entre os demais analitos não foi satisfatória, existindo a coeluição do padrão vinclozolina, aos padrões fenbuconazol e flusilazol, descartando a possibilidade de usar o metanol como solvente orgânico na fase móvel.

Após os testes realizados e a não obtenção de uma separação satisfatória dos analitos, optou-se por selecionar aquele de maior solubilidade em meio aquoso para dar continuidade ao trabalho. Neste caso, o padrão flusilazol, pois no que diz respeito a um cenário real, sua solubilidade é significativamente maior que o fenbuconazol, ( $41,9 - 2,5 \text{ mg L}^{-1}$  a  $20^\circ \text{C}$ ), respectivamente [32].

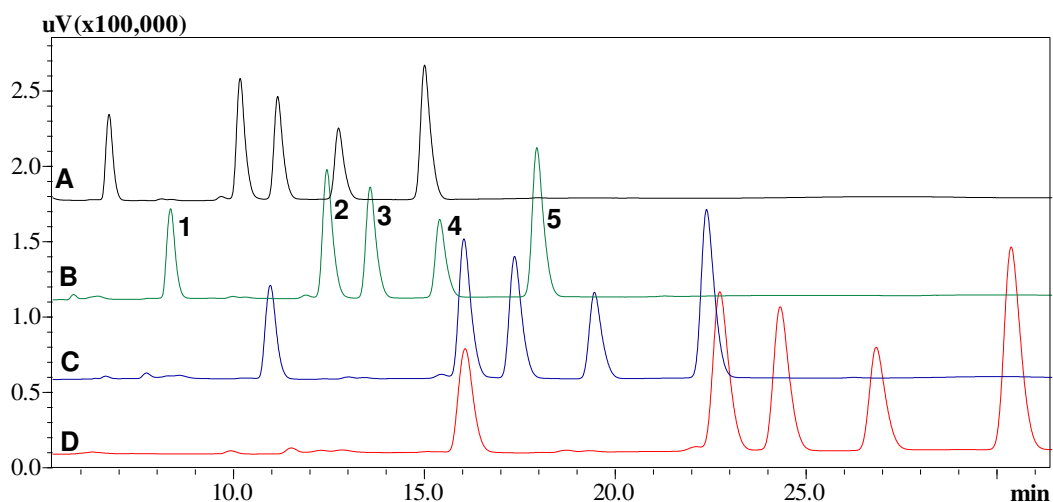
#### 4.1.3- Testes da vazão da fase móvel

O último parâmetro verificado para otimização das condições cromatográficas de análise foi a influência da vazão da fase móvel na separação dos compostos. Pois, sabe-se que a separação dos analitos é realizada levando-se em consideração as interações do soluto com os solventes da fase móvel, as quais são resultantes de propriedades tais como polaridade, viscosidade, pH e outros [59].

A vazão da fase móvel (ou fluxo da fase móvel) é responsável pela velocidade de difusão de massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária. A vazão da fase móvel influencia na retenção dos compostos. O aumento da velocidade da fase móvel diminui o tempo de interação do analito com a fase estacionária da coluna e, consequentemente, diminui o fator de retenção do analito. Assim, a variação do fluxo e da composição da fase móvel permite aumentar ou diminuir a retenção do analito, refletindo consequentemente na separação dos compostos da matriz [59].

Logo, foi utilizada uma solução dos cinco padrões selecionados, epoxiconazol, fenarimol, flusilazol, flutriafol, e vinclozolina, em concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para avaliar esse fator. O fluxo da fase móvel foi variado em 1,0; 0,8; 0,6 e  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ . Os cromatogramas das análises são apresentados na Figura 16.

**Figura 16:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-VIS/DAD de uma solução dos 5 padrões em concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . (A) 1,0 (B) 0,8 (C) 0,6 (D) 0,4  $\text{mL min}^{-1}$ . Para condições de análise ver a Tabela E no apêndice.



1- Flutriafol, 2- Fenarimol, 3- Epoxiconazol, 4- Flusilazol, 5- Vinclozolina.

Foi constatado, observando a Figura 16, que o fluxo de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  foi o mais apropriado para a análise desses analitos, uma vez que quando o fluxo foi diminuído, a corrida cromatográfica fica mais longa e os picos, mais alargados, e com o aumento do fluxo houve pouca diferença entre os tempos de retenção.

Assim, após a seleção do padrão flusilazol, da temperatura a  $30^\circ \text{C}$  e as condições cromatográficas definidas, que consistiu em utilizar uma coluna Synergi RP-80 Å, um fluxo da fase móvel  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ , eluição por um gradiente com fase móvel composta pela mistura Acetonitrila:Água em um tempo de corrida de 35 minutos, obteve-se uma análise simultânea dos agrotóxicos e um cromatograma com picos bem definidos e com boa separação (Figura 16-B), sendo identificados os tempos de retenção dos analitos na Tabela 8.

**Tabela 8:** Tempo de retenção dos agrotóxicos estudados. Para condições cromatográficas de análise ver item 3.8.

<b>Número de Identificação</b>	<b>Perturbadores Endócrinos</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
1	Flutriafol	8,69
2	Fenarimol	13,23
3	Epoxiconazol	14,51
4	Flusilazol	16,44
5	Vinclozolina	19,07

Posteriormente às otimizações das condições cromatográficas, foram iniciados os ensaios de extração de agrotóxicos em água, utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE).

#### **4.2- Otimização do preparo de amostra utilizando a extração em fase sólida (SPE)**

A determinação de agrotóxicos em água geralmente requer um pré-tratamento da amostra, pois se os compostos interferentes não forem removidos poderão afetar a identificação e a quantificação. O pré-tratamento inclui o isolamento e a pré-concentração dos analitos. Por essas razões optou-se por trabalhar com a SPE, por ser uma técnica capaz de extrair e pré-concentrar os analitos de interesse e por ser possível utilizar adsorventes alternativos [10].

Os testes iniciais foram baseados no trabalho de BRITO et al., 2002 [63], o qual fez uso de cartuchos Sep-Pak Vac C<sub>18</sub> e metanol como solvente de eluição para uma extração em fase sólida (SPE) de agrotóxicos em água de coco. Todavia para determinação de agrotóxicos em água, optou-se por fazer a eluição com acetronitrila, tendo em vista que este é o solvente utilizado como fase móvel da análise cromatográfica em modo reverso.

#### 4.2.1- Seleção do adsorvente

Na SPE a escolha do conjunto solvente/adsorvente mais adequado está diretamente relacionada à polaridade e a solubilidade dos analitos, bem como a natureza da matriz, de modo que o isolamento dos analitos mais polares é realizado com adsorventes polares e os menos polares com os adsorventes apolares [64,10].

Desse modo, testes com adsorventes de natureza polar, a exemplo de sílica gel, adsorvente que apresenta caráter ácido, o que melhor permite a retenção de compostos de caráter básico; Florisil, utilizado para reter agrotóxicos de caráter polar; e alumina neutra, que é usado como suporte sólido e por ser anfótero, possibilitando a retenção de compostos ácidos ou básicos, além de ser empregada na retenção de compostos lipofílicos [65].

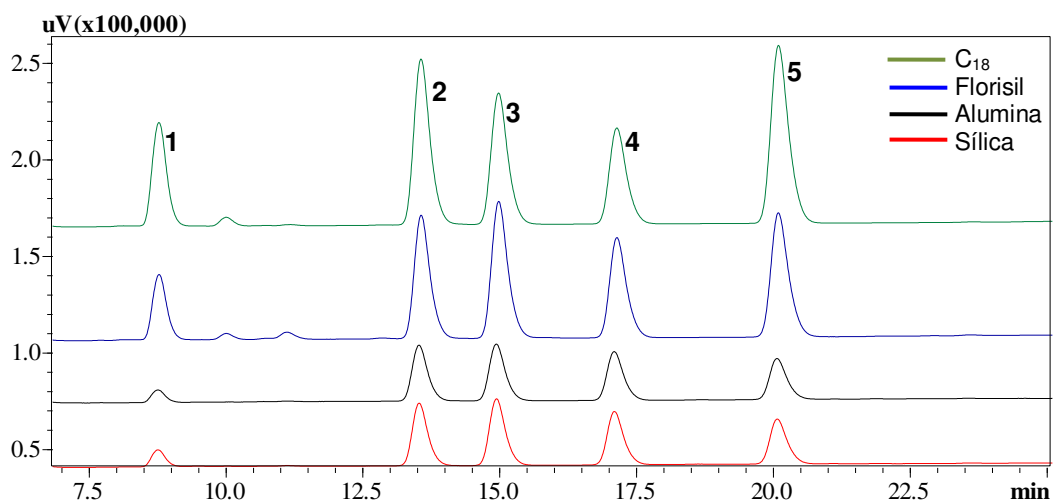
Como também os de natureza apolar, como o C<sub>18</sub>, que geralmente é utilizado para aplicações que requerem uma fase apolar quimicamente modificada, foram avaliados para a extração dos analitos.

O solvente de eluição utilizado para os testes foi acetonitrila por ser considerado um dos melhores solventes extratores para análise de agrotóxicos em cromatografia líquida e podendo ser empregado para analitos de diferentes polaridades. Além disso, o uso da acetonitrila evita a adição de mais uma etapa de secagem e retomada de solvente que compõe a fase móvel do sistema cromatográfico [65, 66].

A Figura 17 apresenta os perfis cromatográficos dos extratos obtidos a partir de diferentes adsorventes, podendo constatar que os adsorventes foram capazes de extrair os análogos, no entanto o adsorvente C<sub>18</sub> foi o que apresentou o melhor perfil com picos mais intensos e definidos.



**Figura 17:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-VIS/DAD das análises dos extratos com diferentes adsorventes em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para condições de análise ver tópico 3.9.



1- Flutriafol, 2- Fenarimol, 3- Epoxiconazol, 4- Flusilazol, 5- Vinclozolina.

Foram realizados ensaios em duplicata para cada adsorvente e os valores de recuperação nos extratos foram calculados a partir da solução padrão de comparação de concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A Tabela 9 mostra os valores percentuais de recuperação e os coeficientes de variação (CV) obtidos para os adsorventes analisados.

**Tabela 9:** Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em água em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , por SPE utilizando o adsorventes comerciais e HPLC UV-VIS/DAD.

Perturbadores Endócrinos	Adsorvente			
	Recuperação Média $\pm$ CV (%) (n=2)			
	Alumina	C18	Florisil	Sílica
Flutriafol	$10 \pm 8$	$97 \pm 0,5$	$57 \pm 0,6$	$13 \pm 13$
Fenarimol	$31 \pm 2$	$101 \pm 0,2$	$61 \pm 14$	$35 \pm 6$
Epoxiconazol	$40 \pm 0,4$	$99 \pm 0,2$	$92 \pm 3$	$48 \pm 2$
Flusilazol	$47 \pm 1$	$98 \pm 1$	$91 \pm 3$	$52 \pm 1$
Vinclozolina	$19 \pm 11$	$96 \pm 0,6$	$61 \pm 4$	$21 \pm 12$

Os valores de recuperação foram calculados com base na Equação 1, provenientes da quantificação das áreas integradas dos picos cromatográficos dos extratos fortificados e dos picos da solução comparação. O adsorvente C<sub>18</sub> se mostrou o mais eficiente para a extração dos agrotóxicos, proporcionando porcentagens de recuperações de  $96 \pm 0,6\%$  a  $101 \pm 0,2\%$ , dentro do valor aceitável estabelecido pela literatura para agrotóxicos de 70 a 120% e um ótimo coeficiente de variação cujo valor seja no máximo  $\pm 20\%$  [33].

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do Extrato}}{\text{Área da Solução Comparação}} \times 100 \quad (1)$$

Segundo Caldas (2011) [10], é comum o uso de adsorventes hidrofóbicos, como C<sub>18</sub>, em análise ambiental, particularmente no isolamento e pré-concentração de agrotóxicos em águas, pois essa fase pode diferenciar e isolar o analito dos compostos interferentes presentes nas amostras. Deve-se também os bons valores de recuperação à baixa interação dos analitos com a superfície do adsorvente o que permite que sejam eluidos mais facilmente pela acetonitrila.

Assim sendo, diante dos resultados obtidos, o C<sub>18</sub> foi selecionado para os ensaios de extração por SPE.

#### **4.3- Otimização da SPE utilizando o biocarvão como adsorvente alternativo**

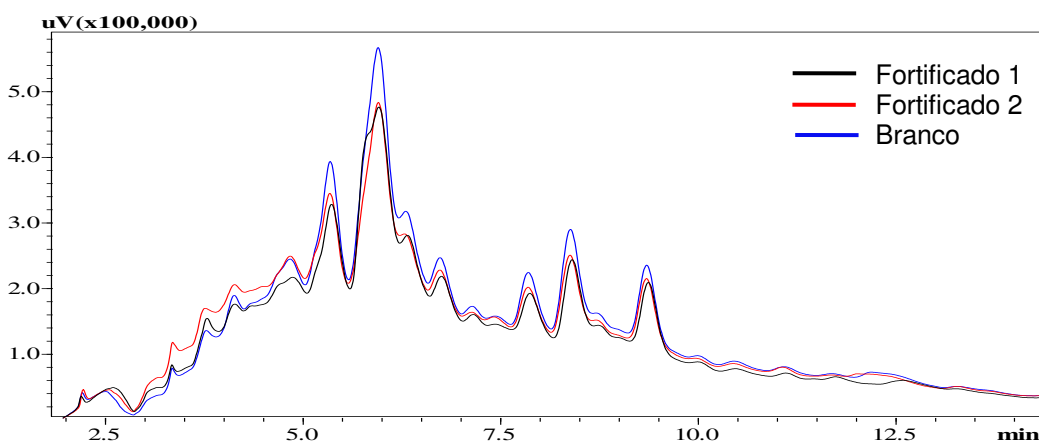
##### *4.3.1- Seleção do biocarvão*

Sabendo-se que as características do biocarvão resultam da matéria-prima e da temperatura de pirólise em que foi submetida, foram selecionados biocarvões provenientes de diferentes biomassas e diferentes formas de obtenção, a fim de conhecer a eficiência do adsorvente alternativo para extração em fase sólida dos agrotóxicos epoxiconazol, fenarimol, flusilazol, flutriafol e vinclozolina.

A princípio, o biocarvão obtido a partir de rejeitos da goiaba foi selecionado para realizar extração dos agrotóxicos em concentração de  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Consequentemente foram preparados cartuchos de SPE contendo 500 mg do biocarvão, igualmente aos comerciais fazendo uso do mesmo procedimento experimental utilizado para o adsorvente  $\text{C}_{18}$ . Para procedimento ver o item 3.8.

A Figura 18 evidencia que existe pouca diferença entre o extrato branco e os fortificados, mostrando que o biocarvão ainda se encontra inadequado para extração dos analitos. Podendo-se atribuir tal comportamento à “baixa” temperatura ( $350^\circ\text{C}$ ), a que o carvão foi pirolisado, não sendo capaz de eliminar os compostos orgânicos interferentes presentes na biomassa, assim como não se obtém uma área superficial propícia para a adsorção de compostos orgânicos [42,43].

**Figura 18:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-VIS/DAD das análises dos extratos em  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  e do branco empregando o biocarvão de goiaba como adsorvente. Para condições de análise ver tópico 3.9.



A Figura 19 mostra o cartucho com o biocarvão de goiaba durante a extração dos agrotóxicos, confirmando que ainda restam muitos compostos orgânicos e que os solventes utilizados na etapa de condicionamento foram capazes de arrastá-los, tornando o extrato de coloração bastante escura.

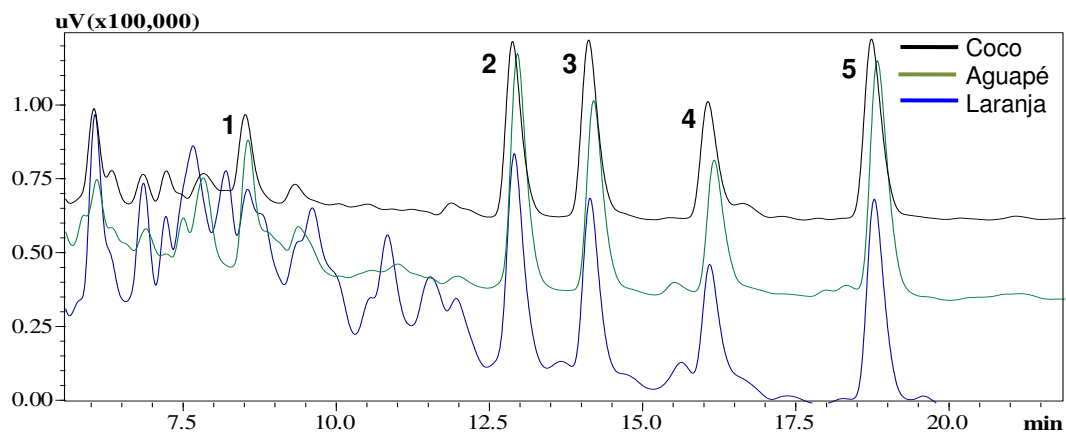
**Figura 19:** Extração utilizando o biocarvão de goiaba como adsorvente.



Após conhecer o perfil cromatográfico e eficiência do biocarvão produzido a temperaturas reduzidas, foram avaliados biocarvões produzidos sob uma maior temperatura, a exemplo do biocarvão de aguapé (*Eichhornia crassipes*) obtido a 500 °C, o biocarvão de coco e biocarvão de laranja, ambos obtidos a 450 °C.

No entanto, com o intuito de melhor observar a presença dos analitos nas análises cromatográficas, resolveu-se realizar ensaios de extração em concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e para evitar o consumo dos biocarvões cedidos foi utilizado apenas 200 mg do material para empacotar os cartuchos, modificando também o volume do eluente (acetonitrila) que foi de 5 mL para 10 mL. A Figura 20 mostra os perfis cromatográficos dos biocarvões avaliados.

**Figura 20:** Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-VIS/DAD das análises dos extratos em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , extraídas utilizando diferentes biocarvões como adsorvente da SPE. Para condições de análise ver tópico 3.9.



2- Flutriafol, 2- Fenarimol, 3- Epoxiconazol, 4- Flusilazol, 5- Vinclozolina.

É possível observar, de acordo com a Figura 19, que os biocarvões se mostraram promissores para a extração dos agrotóxicos epoxiconazol, fenarimol, flusilazol, flutriafol e vinclozolina em água e que apresentam perfis cromatográficos semelhantes. Pode-se notar também que o aumento da temperatura no processo de obtenção dos adsorventes ( $350 - 450/500 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) favoreceu o desempenho do material, no qual pode se atribuir ao aumento da área superficial e porosidade. No entanto, ainda é possível perceber a presença de interferentes no início da corrida cromatográfica, entretanto é bem inferior ao biocarvão de goiaba.

A Tabela 10 mostra a eficiência dos biocarvões, na qual todos apresentam recuperações satisfatórias e baixos coeficientes de variação, dando ênfase ao biocarvão de coco que obteve maiores recuperações, entre 54-97%, e um perfil cromatográfico mais limpo que os demais, sendo selecionado para dar continuidade ao trabalho.

**Tabela 10:** Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em água em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , por SPE utilizando biocarvões como adsorvente e HPLC UV-VIS/DAD.

Perturbadores Endócrinos	Biocarvão Recuperação Média $\pm$ CV (%) (n=2)		
	Aguapé	Coco	Laranja
Flutriafol	$55 \pm 0,5$	$54 \pm 6$	$15 \pm 0,4$
Fenarimol	$82 \pm 0,9$	$83 \pm 0,7$	$71 \pm 1$
Epoxiconazol	$82 \pm 0,6$	$97 \pm 1$	$78 \pm 0,4$
Flusilazol	$82 \pm 1$	$91 \pm 0,3$	$85 \pm 10$
Vinclozolina	$74 \pm 2$	$80 \pm 4$	$70 \pm 0,02$

#### 4.3.2- Caracterização do biocarvões avaliados

Paralelamente aos ensaios de extração dos analitos, foi realizada a caracterização dos biocarvões avaliados com o propósito de conhecer a composição dos mesmos, fazendo uso das técnicas de CHN, IV e MEV.

##### 4.3.2.1- Análise Elementar (CHN)

A princípio foi realizada a análise elementar dos biocarvões a fim de conhecer o teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio. A Tabela 11 reporta os valores resultantes das análises.

**Tabela 11:** Teor de C, H, N e O dos biocarvões estudados.

Biocarvão	% C	% H	%N	%O*
Aguapé	40,80	2,84	2,07	54,29
Coco	67,46	2,69	0,85	28,98
Goiaba	51,00	4,16	1,23	43,61
Laranja	65,15	3,27	1,72	29,86

\*O percentual de oxigênio foi calculado da fórmula:  $\text{O} (\%) = 100\% - (\text{C}(\%) + \text{H}(\%) + \text{N}(\%))$ .

Pode-se observar, na Tabela 11, que o biocarvão de aguapé e de goiaba apresentam um teor de oxigênio maior que os demais, sendo justificado pela diferença no procedimento de obtenção dos adsorventes. Uma vez que no

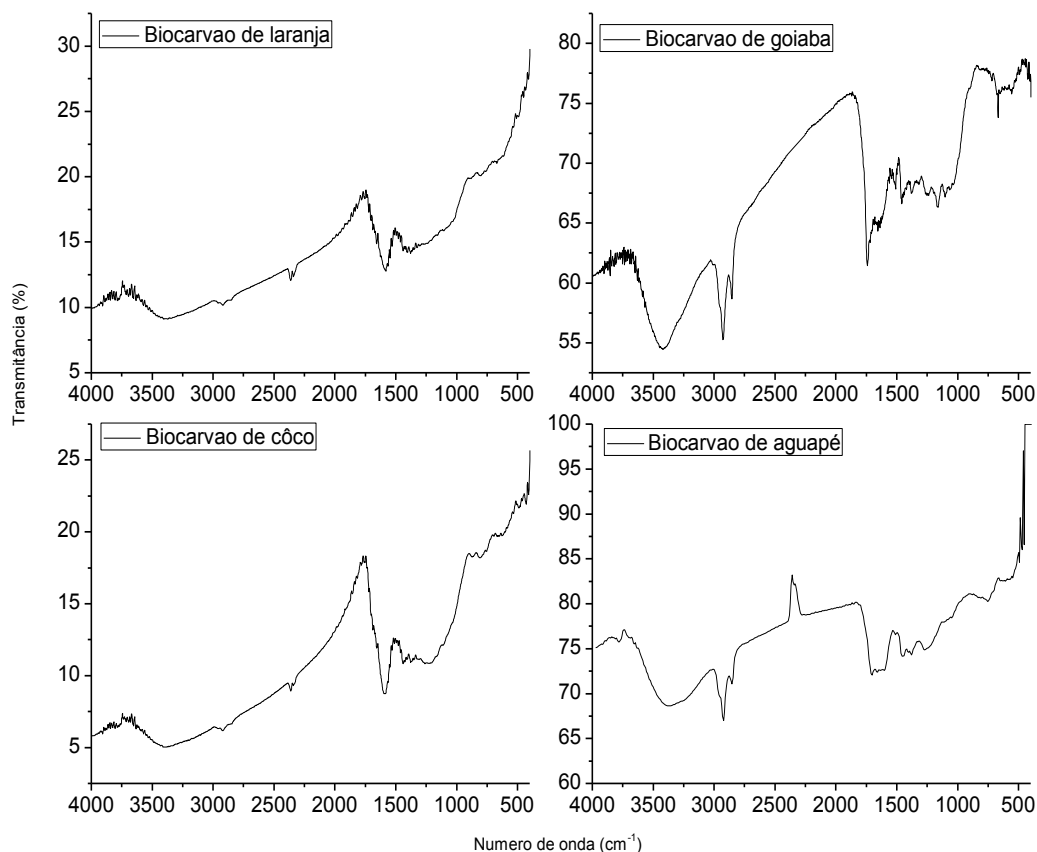
processo de pirólise para obter o biocarvão de aguapé e goiaba, esperou-se o forno atingir uma temperatura de 500 °C e 350 °C, respectivamente, para então iniciar a queima da biomassa por 30 minutos. Ao passo que para a obtenção do biocarvão de coco e laranja, a biomassa foi pirolisada a uma taxa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> até uma temperatura de 450 °C, totalizando em 90 minutos de pirolise do material. Com base nisso, pode-se evidenciar uma pirolise mais efetiva para o biocarvões de coco e laranja refletindo em maior teor de carbono comparado aos biocarvões de aguapé e goiaba.

#### 4.3.2.2- Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV)

A espectroscópica de absorção na região do Infravermelho (IV) dos biocarvões foi realizada com o propósito de conhecer os grupos funcionais presentes nos adsorventes. Observando a Figura 20 nota-se que o biocarvão de coco e laranja apresentam espectros semelhantes, possuindo poucos grupos funcionais e de baixa intensidade, enquanto que o biocarvão de aguapé e goiaba apresentam bandas largas e intensas o que comprova a presença de uma maior quantidade de grupos funcionais [38].

Diante disso, confirma-se que a relação temperatura/tempo no processo de obtenção dos adsorventes foi um fator determinante para que se mantivessem os grupos funcionais presentes nas biomassas, visto que o tempo de 30 minutos não foi suficiente para a clivagem das ligações do biocarvão de aguapé, mesmo sendo pirolisado a uma temperatura de 500° C. E assim, como observado anteriormente na análise elementar, o mesmo apresentou maior teor oxigênio em comparação com os demais, o que condiz que a biomassa foi pirolisada parcialmente. Neste caso, é possível observar que a presença de grupos funcionais não foi determinante para eficiência dos biocarvões na extração de agrotóxicos em água.

**Figura 21:** Espectros de absorção na região do Infravermelho dos biocarvões estudados.



Contudo, é possível perceber na Figura 21, a existência de uma banda em  $3407\text{ cm}^{-1}$  mais larga e intensa nos espectros do biocarvão de aguapé e goiaba atribuída ao estiramento de grupos OH. Em  $2926\text{ cm}^{-1}$  uma banda que pode ser associada ao alongamento de CH de alifáticos e em  $1742\text{ cm}^{-1}$  nota-se uma outra banda, mais intensa no biocarvão de goiabada, referente ao estiramento da ligação C=O.

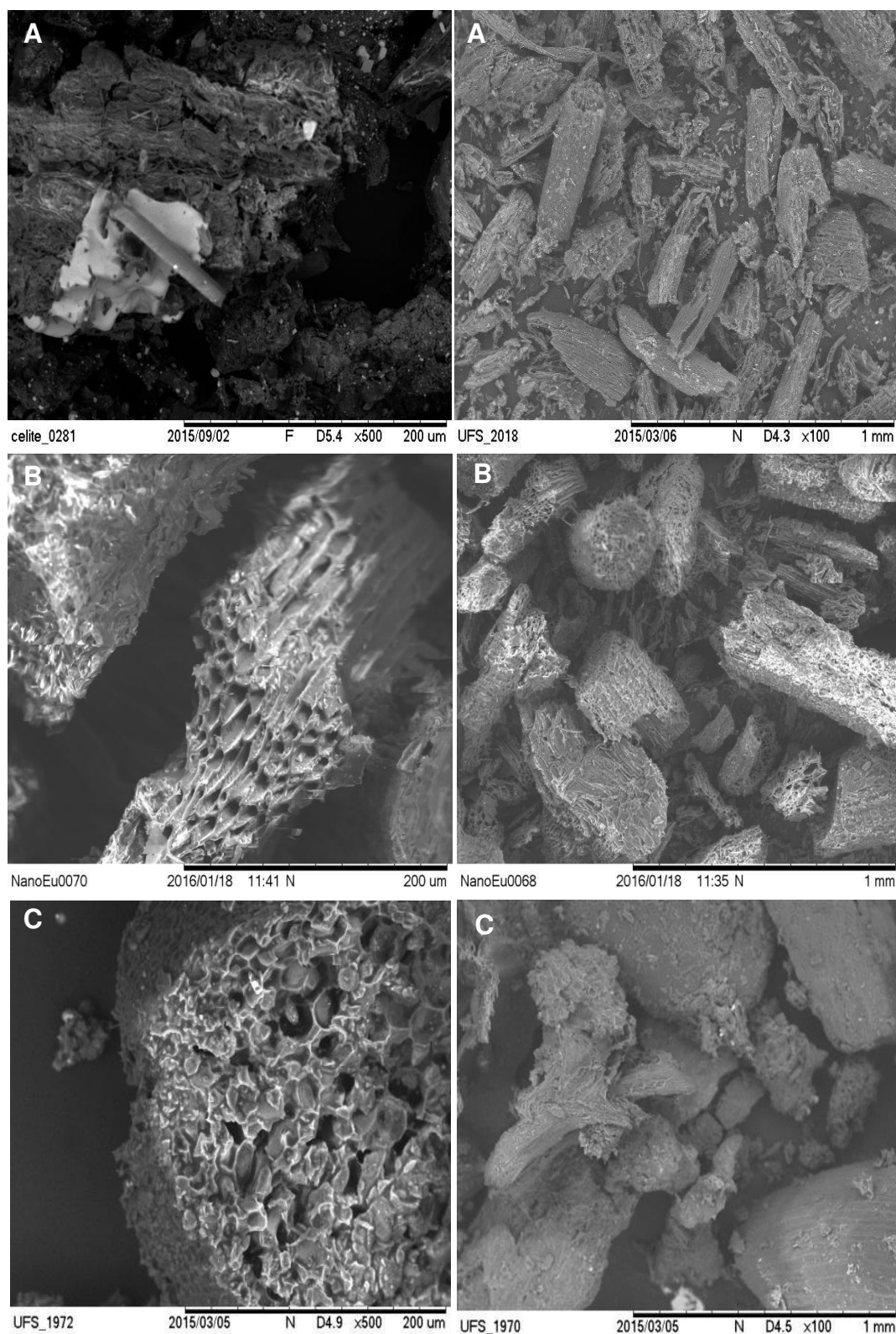
#### 4.3.2.3- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

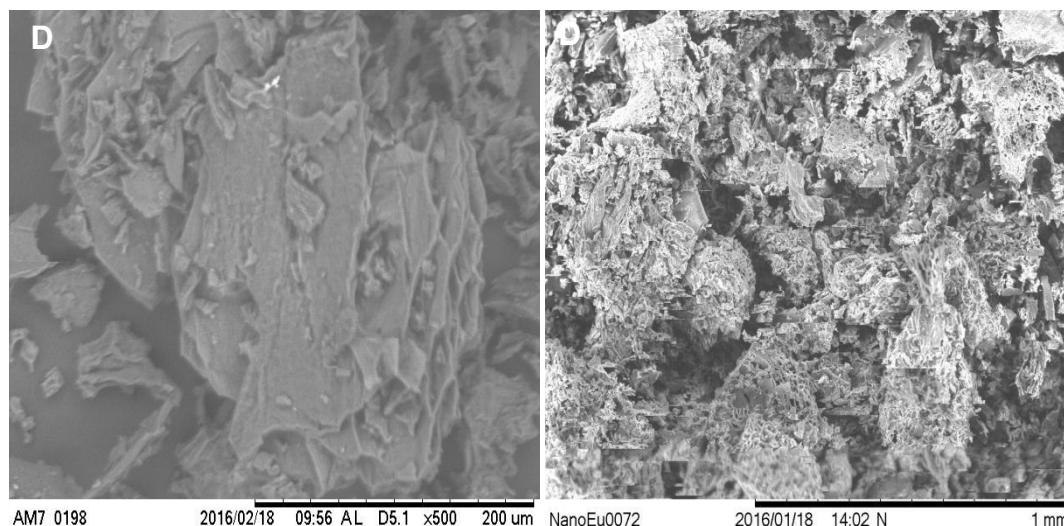
A microscopia eletrônica de varredura foi realizada a fim de conhecer a morfologia dos biocarvões, pois sabe-se que o aumento da temperatura



utilizada no processo de pirolise intensifica a porosidade do material [38,42]. A Figura 22 apresenta imagens das análises dos biocarvões.

**Figura 22:** Microscopia de varredura dos biocarvões estudados. (A) Aguapé; (B) Coco; (C) Goiaba; (D) Laranja.





Como pode se observar na Figura 22, os biocarvões apresentam poros semelhantes em suas superfícies, com exceção do biocarvão de aguapé que possui poros menos definidos quando se comparado ao biocarvão de coco, o que possivelmente favoreceu para a melhor eficiência do adsorvente de coco para extração dos agrotóxicos.

#### 4.3.2.4- Determinação da Área Superficial

A área superficial dos biocarvões utilizados para o desenvolvimento do trabalho foi determinada pela técnica de adsorção de nitrogênio utilizando o método BET e os valores obtidos são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Área superficial dos biocarvões estudados.

Biocarvão	Área Superficial ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ )
Aguapé	93,4
Coco	399,9
Goiaba	230,4
Laranja	191,2

Os valores encontrados para o biocarvão de bagaço de coco e de laranja são considerados elevados quando comparados aos da literatura. Visto que, Li *et al.*, 2008, [67] relatam o uso de biocarvão de coco produzido a uma temperatura de 400 °C com área superficial de 130 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>. Já Chen e Chen, 2009, [68] produziram biocarvões a partir de casca de laranja em diferentes temperaturas para o processo de pirólise, sendo que a 400 °C obteve-se biocarvões com área superficial de 34 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>.

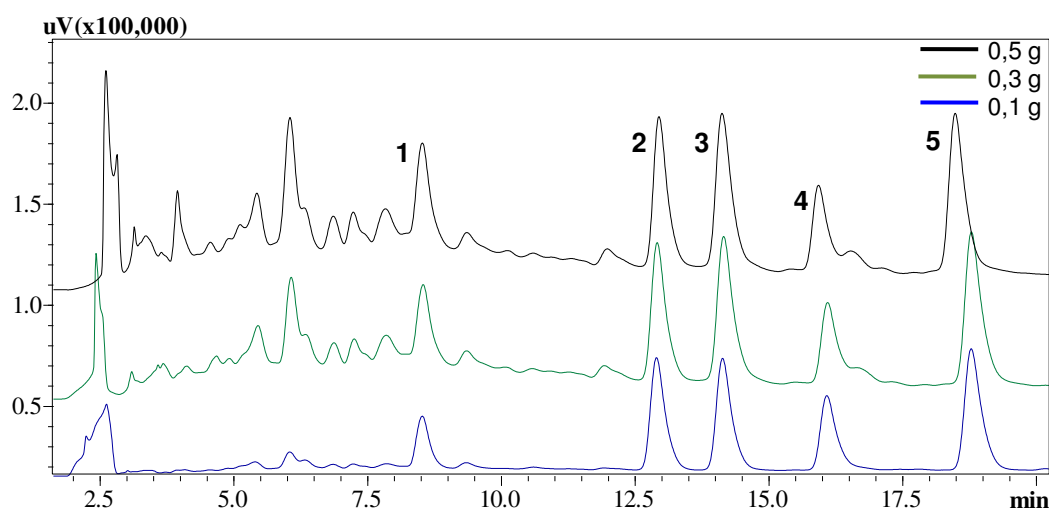
Podemos observar, de acordo com a Tabela 12, que o biocarvão do bagaço de coco foi o que apresentou uma maior área superficial, o que condiz com a literatura, a qual afirma que quanto maior a área superficial do adsorvente maior a capacidade de adsorção de compostos orgânicos [42,43].

Nota-se também, que o valor encontrado para o biocarvão de bagaço de coco (399,9 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>) é próximo ao valor de área superficial do adsorvente comercial C<sub>18</sub> (500 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>), o qual apresentou melhor eficiência nas recuperações dos agrotóxicos [60]. Podendo concluir que a área superficial foi uma fator determinante para justificar a eficiência do adsorvente na extração dos agrotóxicos em água.

#### *4.3.3- Otimização empregando o biocarvão de coco como adsorvente alternativo para SPE*

Inicialmente foram feitas extrações variando a massa do adsorvente alternativo, a fim de avaliar o efeito da quantidade do biocarvão na recuperação dos analitos. Em tal caso, foram testados cartuchos contendo 0,1; 0,3 e 0,5 g do biocarvão de coco, já que se conhecia a eficácia do adsorvente quando se fez uso de 0,2 g para as extrações. Podendo observar os cromatogramas das análises na Figura 23.

**Figura 23:** Sobreposição dos cromatogramas das soluções de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtidos a partir da variação da massa do adsorvente de coco.



A Figura 23 apresenta a diferença na eficiência da extração quando se alterou a quantidade do adsorvente alternativo. Constando que com a redução da massa do adsorvente se obtém um extrato mais limpo com picos definidos e menos intensos, ao passo que quando esta massa é aumentada, os picos dos analitos foram intensificados, assim como os dos interferentes no início da corrida cromatográfica. A Tabela 13 apresenta a média de recuperação de cada agrotóxico quando se variou a quantidade do adsorvente.

**Tabela 13:** Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em água em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , por SPE utilizando diferentes quantidades do biocarvões como adsorvente.

Perturbadores Endócrinos	Massa do adsorvente (g)		
	Recuperação Média $\pm$ CV (%) (n=2)		
	0,1	0,3	0,5
Flutriafol	$50 \pm 0$	$73 \pm 11$	$91 \pm 1$
Fenarimol	$78 \pm 2$	$89 \pm 4$	$94 \pm 1$
Epoxiconazol	$86 \pm 4$	$88 \pm 2$	$93 \pm 3$
Flusilazol	$86 \pm 2$	$92 \pm 4$	$95 \pm 2$
Vinclozolina	$73 \pm 1$	$83 \pm 4$	$94 \pm 0$

É possível verificar, de acordo com a Tabela 13, que quando se utilizaram cartuchos contendo maior massa do biocarvão as recuperações dos analitos foram satisfatórias, sobretudo no que diz respeito ao flutriafol com um aumento de 41% na sua recuperação e os demais analitos com recuperações superiores 91%. Desta forma, mesmo com um perfil cromatográfico com um maior número de sinais, cartuchos contendo 0,5 g do biocarvão foram utilizados para então avaliar o volume do solvente de eluição.

Zang, 2012 [50], afirmou que o volume de eluente tem influencia sobre o desempenho na eluição de agrotóxicos. Assim, foram avaliados os volumes de 5 e 15 mL do eluente, acetonitrila. A Tabela 14 reporta as recuperações dos analitos obtidas com os experimentos realizados.

**Tabela 14:** Influência do volume do eluente na eficiência da extração dos agrotóxicos em água em  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando o biocarvão de coco como adsorvente da SPE.

Perturbadores Endócrinos	Volume do eluente (mL)	
	Recuperação Média $\pm$ CV (%) (n=2)	
	5	15
Flutriafol	$98 \pm 2$	$128 \pm 30$
Fenarimol	$96 \pm 4$	$134 \pm 20$
Epoxiconazol	$107 \pm 2$	$120 \pm 6$
Flusilazol	$87 \pm 4$	$135 \pm 1$
Vinclozolina	$88 \pm 4$	$130 \pm 1$

Quando se observa a Tabela 14, nota-se que com o aumento do volume do eluente, no qual se fazia uso de 10 mL passando a utilizar 15 mL de ACN, as recuperações dos analitos foram superiores a 120%, os quais estão em desacordo com o intervalo aceitável estabelecido pela literatura para agrotóxicos, que é de  $70 \text{ a } 120\% \pm 20\%$  [33]. Quando o volume do eluente foi reduzido para 5 mL foram obtidas recuperações tão satisfatórias tanto quanto com 10 mL. Assim, tomou-se como ótimo o volume de 5 mL do eluente por reduzir o uso de solvente orgânico nas extrações.

#### 4.3.4- Etapa de limpeza do biocarvão de coco

Considerando os interferentes apresentados no início das corridas cromatográficas quando se fez uso do biocarvão como adsorvente da SPE, cogitou-se uma possível ineficácia do adsorvente quando fossem realizados ensaios de extração a concentrações níveis traços. Diante disso, baseado no trabalho de Zang *et al.*, 2012 [50], no qual se utilizou metanol para purificar o biocarvão de bambu, foram realizadas diferentes etapas de limpeza a fim de obter uma redução dos compostos interferentes presentes no adsorvente e consequentemente, um melhor perfil cromatográfico.

Em tal caso, foram avaliados três processos de limpeza do biocarvão. A princípio, foi repetido o procedimento de limpeza realizado por Zang *et al.*, 2012 [50]. Em seguida, foi realizado outro experimento que consistiu em lavar o biocarvão com água deionizada, semelhante a etapa realizada no processo de obtenção dos biocarvões de aguapé e goiaba.

Enquanto que o ultimo experimento consistiu em submeter o biocarvão a um contato direto com o solvente de extração, sob agitação em banho ultrassônico, uma vez que o banho ultrassônico além de promover a extração de compostos orgânicos, promovendo uma purificação dos extratos [69]. Para os três procedimentos de limpeza ver o tópico 3.7.

A Tabela 15 mostra que os procedimentos de limpeza dos extratos não foram favoráveis às recuperações dos agrotóxicos, as quais caíram significativamente. E no que diz respeito a limpeza do perfil cromatográfico, não houve nenhum progresso.

**Tabela 15:** Eficiência das etapas de limpeza do biocarvão em concentração de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Perturbadores Endócrinos	Procedimento de Limpeza Recuperação Média $\pm$ CV (%) (n=2)		
	Metanol	Limpeza	Ultrassom
Flutriafol	$80 \pm 17$	$73 \pm 17$	$73 \pm 22$
Fenarimol	$82 \pm 16$	$75 \pm 1$	$74 \pm 7$
Epoxiconazol	$74 \pm 13$	$48 \pm 46$	$88 \pm 15$
Flusilazol	$64 \pm 20$	$91 \pm 31$	$60 \pm 36$
Vinclozolina	$72 \pm 26$	$71 \pm 6$	$67 \pm 9$

Desta forma, com a escolha do melhor adsorvente, o biocarvão de produzido a partir de rejeitos de coco, a quantidade do biocarvão (0,5 g), o volume do eluente (5 mL), foram obtidos bons resultados de recuperações dos agrotóxicos epoxiconazol, fenarimol, flusilazol, flutriafol e vinclozolina em água, como mostra a Tabela 16.

**Tabela 16:** Valores de recuperação média dos agrotóxicos em água por SPE utilizando o biocarvão de coco como adsorvente e HPLC UV-VIS/DAD.

Perturbadores Endócrinos	Nível de concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) Recuperação Média $\pm$ CV (%) (n=2)		
	1,0	0,75	0,5
Flutriafol	93 $\pm$ 1	89 $\pm$ 8	84 $\pm$ 19
Fenarimol	93 $\pm$ 5	93 $\pm$ 12	93 $\pm$ 9
Epoxiconazol	119 $\pm$ 12	84 $\pm$ 3	109 $\pm$ 8
Flusilazol	76 $\pm$ 13	88 $\pm$ 14	75 $\pm$ 17
Vinclozolina	75 $\pm$ 9	75 $\pm$ 15	75 $\pm$ 19

A Tabela 16 evidencia também que os adsorventes comerciais utilizados na extração em fase sólida (SPE), geralmente de alto custo, podem ser substituídos por adsorventes alternativos, como é o caso do biocarvão, proveniente de um rejeito da indústria alimentícia que é o bagaço de coco.

Sendo que o único inconveniente de se fazer uso do biocarvão em sistemas cromatográficos com detector UV-Vis/DAD é que os compostos orgânicos restantes no biocarvão podem gerar sinais que dificultam a quantificação dos analitos em baixas concentrações. Tornando-se necessário um estudo de procedimentos adicionais para uma purificação do biocarvão.

#### 4.4- Validação do método analítico

Após o desenvolvimento do método analítico de extração em fase sólida utilizando adsorventes comerciais e alternativos, o método foi submetido a avaliação de diferentes parâmetros de qualidade a fim de certificar que fornecerá resultados confiáveis nas condições em que fora aplicado. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão,

exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, cujos resultados são descritos a seguir:

#### 4.4.1- Linearidade e Sensibilidade

Para que a linearidade do método para os agrotóxicos fosse conhecida foi necessário estabelecer um método para análise cromatográfica. Foram preparadas curvas analíticas com padrões dos agrotóxicos selecionados, sendo que para a construção das curvas analíticas foi preparada uma solução conjunta de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila dos cinco padrões, da qual foram preparadas soluções nas concentrações 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5;  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Após análise, as curvas foram construídas a partir da relação entre a concentração e o sinal de cada analito. As curvas analíticas são reportadas na Figura A no apêndice. A Tabela 17 apresenta os valores do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e as equações da reta obtidas a partir das curvas analíticas de cada agrotóxico estudado por HPLC UV-VIS/DAD.

**Tabela 17:** Valores de coeficientes de determinação e equações da reta dos agrotóxicos estudados em um intervalo de concentração de  $0,01 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

<b>Perturbadores Endócrinos</b>	<b>Equação da Reta</b>	<b>Coeficiente de Determinação (<math>r^2</math>)</b>
Flutriafol	$y = 110739x - 3469,8$	0,9998
Fenarimol	$y = 195067x - 4926,1$	0,9998
Epoxiconazol	$y = 161938x - 4163$	0,9998
Flusilazol	$y = 124494x - 3311,7$	0,9998
Vinclozolina	$y = 241725x - 6587,3$	0,9998

Na Tabela 17 verifica-se que os coeficientes de determinação foram iguais a 0,9998, o que indica uma excelente resposta linear, visto que a ANVISA recomenda um coeficiente de determinação igual a 0,99, enquanto o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) aceita valores acima de 0,90 [22,49].

Ainda fazendo uso das equações da reta obtidas, foi verificada a sensibilidade do método avaliando os coeficientes angulares, sabendo que quanto maior o coeficiente maior a sensibilidade do método desenvolvido ao



analito. Posto isso, pode-se afirmar que o método apresenta maior sensibilidade ao padrão vinclozolina ao passo que ao flutriafol possui uma sensibilidade mais baixa [48].

#### 4.4.2- Precisão e Exatidão

No presente trabalho a precisão foi determinada por meio da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). A repetibilidade foi avaliada analisando-se 7 vezes uma solução padrão mix dos 5 agrotóxicos selecionados em concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais e para precisão intermediária as análises foram realizadas em 3 dias diferentes. Os resultados das análises são expressos pelo coeficiente de variação apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18:** Valores de precisão intradia e interdia dos agrotóxicos em concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Perturbadores Endócrinos	Intradia CV(%) (n=7)			Interdia CV(%) (n=3)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
Flutriafol	0,4	0,1	0,2	0,6
Fenarimol	0,5	0,2	0,2	1
Epoxiconazol	0,6	0,1	0,2	0,8
Flusilazol	1	0,5	0,4	0,6
Vinclozolina	0,3	0,2	0,2	0,7

Os resultados da precisão intradia e interdia descritos na Tabela 18 são satisfatórios, dado que estão dentro do critério de aceitação de 5%, demonstrando a precisão do método [48, 49].

Para a exatidão do método observaram-se os valores de recuperação e os coeficientes de variação das extrações em fase sólida realizadas nos níveis de fortificação mais baixos, tanto quando se fez uso do  $\text{C}_{18}$  como adsorvente quanto o biocarvão. Notando, de acordo com a Tabela 19, que quando se fez uso do  $\text{C}_{18}$ , para todos os agrotóxicos, com exceção do flutriafol, o método desenvolvido se mostrou exato até o nível de fortificação de  $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,

com valores de recuperação entre  $72\% \pm 10\%$  e  $117\% \pm 3\%$  enquanto que para o flutriafol só foi possível obter uma boa exatidão até o nível  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  apresentando um valor de recuperação de  $77\% \pm 16\%$ .

Ao passo que ao utilizar o biocarvão como adsorvente o método demonstrou uma boa exatidão até o nível de fortificação de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  com valores que vão de  $75\% \pm 9\%$  a  $119\% \pm 12\%$  para os agrotóxicos epoxiconazol, fenarimol, flusilazol, flutriafol e vinclozolina. Certificando a eficiência do método em baixas concentrações, tanto quando se fez uso do  $\text{C}_{18}$  quando do biocarvão de coco como adsorvente da SPE, visto que os resultados encontram-se dentro faixa de 70-120% e os coeficientes de variação inferiores a 20%, conforme sugere a literatura [33].

**Tabela 19:** Coeficiente de variação do método SPE para determinação de agrotóxicos em água utilizando  $\text{C}_{18}$  e biocarvão como adsorvente.

Perturbadores Endócrinos	$\text{C}_{18}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) CV (%)			Biocarvão de coco ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) CV (%)		
	0,1	0,05	0,025	1	0,75	0,5
Flutriafol	$72 \pm 10$	$77 \pm 16$	$60 \pm 37$	$93 \pm 1$	$89 \pm 8$	$84 \pm 19$
Fenarimol	$86 \pm 15$	$97 \pm 4$	$104 \pm 5$	$93 \pm 5$	$93 \pm 12$	$93 \pm 9$
Epoxiconazol	$100 \pm 3$	$101 \pm 10$	$99 \pm 2$	$119 \pm 12$	$84 \pm 3$	$109 \pm 8$
Flusilazol	$97 \pm 8$	$90 \pm 8$	$117 \pm 3$	$76 \pm 13$	$88 \pm 14$	$75 \pm 17$
Vinclozolina	$75 \pm 12$	$94 \pm 4$	$105 \pm 11$	$75 \pm 9$	$75 \pm 15$	$75 \pm 19$

#### 4.4.3- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir do método visual. No qual para definir o LD foram feitas diluições sucessivas de uma solução padrão dos 5 agrotóxicos e analisadas até que não fosse possível a detecção do analito. Ao passo que para determinar o LQ, foram realizadas extrações utilizando o  $\text{C}_{18}$  e o biocarvão para que fosse observado o nível de fortificação limite para que ao analitos fossem quantificados de forma segura. A Tabela 20 reporta os resultados obtidos com as análises.

**Tabela 20:** Limite de Detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método utilizando o C18 e o biocarvão como adsorvente da SPE.

Perturbadores Endócrinos	C <sub>18</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Biocarvão de coco ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	LD	LQ	LD	LQ
Flutriafol	0,025	0,05	0,025	0,5
Fenarimol	0,01	0,025	0,01	0,5
Epoxiconazol	0,01	0,025	0,01	0,5
Flusilazol	0,01	0,025	0,01	0,5
Vinclozolina	0,025	0,025	0,025	0,5

Com a Tabela 20 pode verificar que os limites de detecção variaram entre 0,01-0,025  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os limites de quantificação 0,025-0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , uma vez que quando se fez uso do biocarvão de coco o LQ foi mais alto por não se tratar de um adsorvente com um alto grau de pureza, como é o caso do comercial C<sub>18</sub>.

#### 4.5- Aplicação do método em amostra real

A região do açude da Marcela foi selecionada para o estudo por ser um ambiente propício à contaminação dos recursos hídricos devido à alta produção de hortaliças a fim de abastecer o mercado do Estado de Sergipe. Além disso, em virtude das descargas de esgotos domésticos sem tratamento de regiões próximas ao açude, a Administração Estadual do Meio Ambiente (ADEMA) tem realizado o monitoramento do local, o qual constatou níveis elevados de bactérias coliformes termotolerantes e alta concentração de fósforo em amostras de água do açude [70].

Com as análises das amostras de água coletadas as margens do açude e no reservatório de lavagem das hortaliças, não foi possível perceber a presença dos agrotóxicos estudados. Entretanto, com o propósito de avaliar a eficiência do biocarvão de coco na extração dos agrotóxicos em matrizes reais, a água foi fortificada com a solução mix dos agrotóxicos a uma concentração de 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e foram realizados ensaios de extração nas mesmas condições

utilizadas anteriormente para a água ultrapura. Para procedimento de extração ver tópico 3.8. A Tabela 21 reporta as recuperações dos analitos obtidas com os experimentos realizados em amostras reais.

**Tabela 21:** Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em amostra de água real fortificada em  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , por SPE utilizando biocarvão de coco como adsorvente.

<b>Perturbadores Endócrinos</b>	<b>Local de coleta</b>	
	<b>Recuperação Média <math>\pm</math> CV (%) (n=2)</b>	
	<b>Margem</b>	<b>Hortaliças</b>
Flutriafol	$75 \pm 19$	$84 \pm 15$
Fenarimol	$86 \pm 4$	$78 \pm 11$
Epoxiconazol	$77 \pm 17$	$78 \pm 9$
Flusilazol	$83 \pm 5$	$89 \pm 8$
Vinclozolina	$88 \pm 7$	$92 \pm 13$

Foi possível observar que o biocarvão de coco se mostrou promissor como adsorvente alternativo para SPE também para as extrações dos agrotóxicos em amostra real. Garantindo assim, a eficiência do método desenvolvido.

## 5- CONCLUSÕES

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos apresentou uma condição ótima de análise simultânea dos perturbadores endócrinos, epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, flutriafol, e vinclozolina em água. A qual foi constituída por uma coluna Synergi-RP 80 Å com um volume de injeção de 20 µL, um fluxo da fase móvel de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, eluição em modo gradiente com fase móvel composta pela mistura Acetonitrila: Água (v: v) com tempo total de corrida de 35 minutos e um comprimento de onda selecionado de 207nm.

Por sua vez, a técnica de SPE apresentou-se eficiente para a extração dos perturbadores endócrinos em água quando se fez uso do adsorvente comercial C<sub>18</sub>, com valores de recuperação entre 60% ± 37 % a 117% ± 3% para os níveis de concentração de 0,025, 0,05 e 0,1 µg mL<sup>-1</sup>.

O biocarvão produzido a partir de rejeitos de coco se mostrou promissor como adsorvente alternativo para extração em fase sólida, visto que foram obtidas recuperações entre 75% ± 9% - 119% ± 12% para os níveis de concentração 0,5, 0,75 e 1 µg mL<sup>-1</sup>. Contribuindo para o uso sustentável de um rejeito da indústria alimentícia a fim de substituir adsorventes de alto custo.

Os parâmetros de validação apresentaram resultados satisfatórios, o que garante uma boa sensibilidade e eficiência do método desenvolvido para determinação dos perturbadores endócrinos epoxiconazol, fenarimol, fenbuconazol, flutriafol e vinclozolina em água, aplicando a técnica de extração em fase sólida (SPE) e análise por HPLC UV-VIS/DAD.

O método proposto se mostrou adequado e eficiente, podendo ser aplicável a amostras de água possivelmente contaminadas por agrotóxicos.

## 6- REFERÊNCIAS

- [1] WHO, World Health Organization. Chemical safety of drinking-water: Assessing priorities for risk management Chemical. 2007. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/cmp/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/cmp/en/). (Acessado em: 15 de maio de 2015).
- [2] RIBEIRO, A. C. A.; DORES, E. F. G. C.; AMORIM, R. S. S.; LOURENCETTI, C. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova*. v. 36, nº. 2, p. 284-290, **2013**.
- [3] MANGRICH, A. S.; DOUMER, M. E.; MALLMANN, A. S.; WOLF, C. R. química verde no tratamento de águas: uso de coagulante derivado de tanino de *Acacia Mearnsii*. *Revista Virtual da Química*. v. 6, nº. 1, p. 2-15, **2014**.
- [4] NETO, M. L. F.; SARCINELLIA, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição o processo de atualização da legislação brasileira. *Engenharia Sanitária Ambiental*.v.14 n.1, 69-78, **2009**. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S11341522009000100008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S11341522009000100008&script=sci_arttext). (Acessado em 09 de janeiro de 2015).
- [5] HASSAN, A. A ; ANWAR, Z. M.; RIZK, M. A.; Khairy, G. M.; EL-ASFOURY, M.H.; Determination oforganophosphorus pesticides in water samples by using a new sensitive luminescent probe of Eu (III) complex. *Journal of Luminescence* v.157, p. 371–382, **2015**.
- [6] MNIF, W.; HASSINE, A. I. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 8, p.2265-2303. **2011**.
- [7] TABB, M.M.; BLUMBERG, B.; New modes of action for endocrine-disrupting chemicals: Minireview. *Molecular Endocrinology*. v.20, p.475-482, **2006**.

- [8] LANÇAS, Fernando M. Extração em fase solida - SPE. São Carlos, SP: RIMA, (Métodos cromatográficos de análise;4) 2004.
- [9] BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (spe) e micro extração em fase sólida (spme) de piretróides em água. *Química Nova*, v. 24, nº 2, p. 172-175, **2001**.
- [10] CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; e ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, nº. 9, p. 1604-1617, **2011**.
- [11] WEN, Y.; CHEN, L.; LI, J.; LIU, D.; CHEN, L. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. *Trends in Analytical Chemistry* v.59, p. 26–41, **2014**.
- [12] PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. *Química Nova*. v. 26, nº. 5, p. 738-744, **2003**.
- [13] EPICOCO, M.; OLTRA, V.; JEAN, M. S. Knowledge dynamics and sources of eco-innovation: Mapping the Green Chemistry community. *Technological Forecasting & Social Change*. v.81, p. 388–402, **2014**.
- [14] PROTÁSIO, T. P. et al. Brazilian lignocellulosic wastes for bioenergy production: characterization and comparison with fossil fuels. *BioResources Raleigh*, v.8, n.1, p.1166-1185, **2013**.
- [15] VIEIRA, A. P.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S. et al. Epicarp and mesocarp of babassu (*Orbignya speciosa*): Characterization and application in copper phthalocyanine dye removal. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 22, p. 21–29, **2011**

- [16] TAHA, S. M.; AMERA, M. E.; ELMARSAFY, A. E.; ELKADY, M. Y. Adsorption of 15 different pesticides on untreated and phosphoric acid treated biochar and charcoal from water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. v.2, p.2013–2025, **2014**.
- [17] KEARNS, J.P.; WELLBORN, L.S.; SUMMERS, R.S.; KNAPPE, D.R.U. 2,4-D adsorption to biochars: Effect of preparation conditions on equilibrium adsorption capacity and comparison with commercial activated carbon literature data. *Water Research*. v.62, p. 20-28, **2014**.
- [18] PEIL, G. H. S.; KUSS, A. V.; GONÇALVES, M. do C. F. Avaliação da qualidade bacteriológica da água utilizada para abastecimento público no município de Pelotas–RS–Brasil. *Ciência e Natura*. v. 37, p. 79-84, **2015**.
- [19] OKURA, M. H.; SIQUEIRA, K. B. Enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em água de abastecimento e de minas. *Revista de Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 19, nº. 135, p. 86-91, **2005**.
- [20] BRASIL. Portaria nº 2.914 de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. 12 dez. 2011.
- [21] CANUTO, T. G.; et al. Estimativa do risco potencial de contaminação por pesticidas de águas superficiais e subterrâneas do Município de Tianguá-CE, com aplicação do método de goss e índice de Gus. *Águas Subterrâneas*, **2010**.
- [22] ANVISA: Agência Nacional da Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. (Acessado em 15 de maio de 2015).
- [23] SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos Associados à contaminação da água. *Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 54, **2003**.



- [24] FARAJZADEH, M. A.; KHOSHMMARAM, L. Air-assisted liquid-liquid microextraction-gas chromatography-flame ionization detection: a fast and simple method for the assasmet of triazole pesticides residues in surface water, cucumber, tomato and grape juices sample. *Food Chemistry*, v.3, p.188, **2013**.
- [25] ROBERTS, T.; HUTSON, DAVID. Metabolic Pathways of Agrochemicals. Cornwall, UK. Editors In Chief. **1999**.
- [26] IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/.../lspa/defaulttab.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/.../lspa/defaulttab.shtm). (Acessado em 20 de maio de 2015).
- [27] DAMS, R. I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 7, p.37-44, n. 2, **2006**.
- [28] FERREIRA, J.M.S.; FILHO, M.M. A Cultura do Coqueiro, pragas e métodos de controle. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Sistemas de Produção, Versão Eletrônica, 2007. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Coco/ACulturadoCoqueiro/pragas.htm>. (Acesso em 09 de maio de 2015).
- [29] COCCO, P. On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cadernos de Saúde Pública*. v.18, p. 379-402. **2002**.
- [30] MNIF, W.; PILLON, A.; BALAGUER, P.; BARTEGI, A. Endocrine xenoestrogens disrupters, molecular mechanisms and detection methods. *Therapie*. v.62, p. 369-386. **2007**.
- [31] TOMLIN, C. E. A Word Compendium the Pesticide Manual Incorporating the Agrochemicals Handbook. Tenth Edition, **1994**.

- [32] IUPAC: Foodprint pesticide. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac>. (Acessado em 15 de maio de 2015).
- [33] LANÇAS, Fernando M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Campinas, SP: Editora Átomo, **2009**.
- [34] SIMPSON, N.J.K. Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications. New York: Marcel Dekker, **2000**.
- [35] EFFENDI, A.; GERHAUSER, H.; BRIDGWATER, A. V. Production of renewable phenolic resins by thermochemical conversion of biomass: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.12, n. 8, p. 2092-2116, **2008**.
- [36] AUGUSTO, F.; HANTAO, L. W.; MOGOLLÓN, N. G. S.; BRAGA, S.C.G.N. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 43, p. 14-23, **2013**.
- [37] NAMASIVAYAM, C.; KUMAR, M. D; SELVI, K.; BEGUM, R. A; VANATHI, T.; YAMUNA, R. T. 'Waste' cair Pith – a Potencial Biomass for the Treatment of Dyeing Wastewaters. *Biomass & Energy*, n.21, p. 477 – 483, **2001**.
- [38] TANG, J.; ZHU, W.; KOOKANA, R.; KATAYAMA, A. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 116, n. 6, p. 653-659, **2013**.
- [39] BARROW, C.J. Biochar: Potential for countering land degradation and for improving agriculture. *Applied Geography*, v. 34, p. 21-28, **2012**.
- [40] LEHMANN, J.; JOSEPH, S. Biochar for environmental management-science and technology. Earthscan Publisher, Londres, Reino Unido, **2009**.

[41] LAIRD, D. A. The charcoal vision: a win-win-win scenario for simultaneously producing bioenergy, permanently sequestering carbon, while improving soil and water quality. *Agronomy Journal*, v.100, 178-181, **2008**.

[42] LUO, L.; LOU, L. P.; CUI, X. Y.; WU, B. B.; HOU, J.; XUN, B.; XU, X. H.; CHEN, Y. X. Sorption and desorption of pentachlorophenol to black carbon of three different origins, *Journal of Hazardous Materials*, v. 185, p. 639-646, **2011**.

[43] WANG, F. Y.; WANG, H.; MA, J. W. Adsorption of cadmium (II) ions from aqueous solution by a new low-cost adsorbent-Bamboo charcoal. *Journal of Hazardous Materials*, v. 177, p 300–306, **2010**.

[44] COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; Bonato, Rievina S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, SP: UNICAMP, **2006**.

[45] ISSUFO, C. H. N.; CALU, J.; LOPES, N. P. R.; NAZARETH, T. S. Métodos Cromatográficos. **2009**.

[46] SKOOG, W.; HOLLER, C. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, **2006**.

[47] ARAGÃO, N. M. de; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. de. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, **2009**.

[48] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p.771-780, **2004**.

- [49] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.*
- [50] ZHANG, A.; ZHOU, L.; ZHANG, P.; FAN, X.; WANG, C.; ZHANG, L. Bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the determination of organophosphorus pesticides in water samples by high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, v.45, p. 1971-1979, **2012.**
- [51] HURTADO-SÁNCHEZ, M. C.; ROMERO-GONZÁLEZ, R., RODRÍGUEZ-CÁCERES, M. I.; DURÁN-MERÁS, I.; FRENICH, A. G. Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface Waters. *Journal of Chromatography A*, v. 1305, p. 193-202, **2014.**
- [52] ATRACHE, L. L. E.; SGHAIER, R. B.; KEFI, B. B.; HALDYS, V.; DACHRAOUI, M.; TORTAJADA, J. Factorial design optimization of experimental variables in preconcentration of carbamates pesticides in water samples using solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry determination. *Talanta*, v. 117, p. 392-398, **2013.**
- [53] BONANSEAA, R. I.; AMÉA, M. V.; WUNDERLINB, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere*, v. 90, p. 1860-1869, **2013.**
- [54] SHI, Z.; HU, J.; LI, Q.; ZHANG, S.; LIANG, Y.; ZHANG, H. Graphene based solid phase extraction combined with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for carbamate pesticides analysis in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, v.1355, p. 219-227, **2014.**
- [55] FERNÁNDEZ-RAMOS, C.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. New method for the determination of carbamate and pyrethroid insecticides in water samples

using on-line SPE fused core column chromatography. *Talanta*, v. 129, p. 579–585, **2014**.

[56] ŠATÍNSKÝ, D.; NAIBRTOVÁ, L.; FERNÁNDEZ-RAMOS, C.; SOLICH, P. An on-line SPE–HPLC method for effective sample preconcentration and determination of fenoxycarb and cis, trans-permethrin in surface waters. *Talanta*, v.142, p. 124–130, **2015**.

[57] SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. High-Performance gradient elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model. WILEY. **2007**.

[58] RAIMUNDO JR, I. M.; PASQUINI, C. Espectrometria multicanal e arranjos de fotodiodos. Divulgação. Departamento de Química Analítica – Instituto de Química – UNICAMP. Campinas – SP. **1996**.

[59] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. introduction to modern liquid chromatography. 3 ed. EUA: Editora John Wiley & Sons, **2010**.

[60] PHENOMENEX. <https://www.phenomenex.com/>. (Acessado em 20 de maio de 2015).

[61] BORGES, E. M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. *Química Nova*, v. 33, nº. 4, p. 945-953, **2010**.

[62] SIGMA-ALDRICH: Analytical, Biology, Chemistry & Materials. <https://www.sigmaaldrich.com/>. (Acessado em 29 de maio 2015).

[63] BRITO, N. M.; NAVICKIENE, S.; POLESE, L.; JARDIM, E. F. G.; ABAKERLI, R. B.; RIBEIRO, M. L. Determination of pesticides residues in coconut water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, v. 957, p. 201-209; **2002**.

- [64] AQUINO, A.; SOUZA, M. R.; MACIEL, S. T.; ALEXANDRE, M. D. R.; NAVICKIENE, S. Multiclass MSPD method for pesticide determination in dehydrated *Hyptis pectinata* (sambacaitá) medicinal plant by GC-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22(8), p 1525-1530, **2011**.
- [65] PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxico por cromatografia gasosa. *Química Nova*, v. 32, N. 4, p. 987-995, **2009**.
- [66] MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, v. 1040, p. 259-272, **2004**.
- [67] Li, W.; Yang, K.; Peng, J.; Zhang, L.; Guo, S.; Xia, H. Effects of carbonization temperatures on characteristics of porosity in coconut shell chars and activated carbons derived from carbonized coconut shell chars. *Industrial Crops and Products*. v. 28, p. 190-198, **2008**.
- [68] Chen, B; Chen, Z. Sorption of naphthalene and 1-naphthol by biochars of orange peels with different pyrolytic temperatures. *Chemosphere*. v. 76, p. 127-133, **2009**.
- [69] COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2026-2033, **2009**.
- [70] ADEMA: Administração Estadual do Meio Ambiente. <http://www.adema.se.gov.br/modules/tinyd0/index.php?id=48>. (Acessado em 10 de março de 2016).

## **ANEXO**

AGROTÓXICOS			
2,4 D + 2,4,5 T	94-75-7 (2,4 D) 93-76-5 (2,4,5 T)	µg/L	30
Alaclor	15972-60-8	µg/L	20
Aldicarbe + Aldicarbesulfona + Aldicarbesulfóxido	116-06-3 (aldicarbe) 1646-88-4 (aldicarbesulfona) 1646-87-3 (aldicarbe sulfóxido)	µg/L	10
Aldrin + Dieldrin	309-00-2 (aldrin) 60-57-1 (dieldrin)	µg/L	0,03
Atrazina	1912-24-9	µg/L	2
Carbendazim + benomil	10605-21-7 (carbendazim) 17804-35-2 (benomil)	µg/L	120
Carbofurano	1563-66-2	µg/L	7
Clordano	5103-74-2	µg/L	0,2
Clorpirifós + clorpirifós-oxon	2921-88-2 (clorpirifós) 5598-15-2 (clorpirifós-oxon)	µg/L	30
DDT+DDD+DDE	p,p'-DDT (50-29-3) p,p'-DDD (72-54-8) p,p'-DDE (72-55-9)	µg/L	1
Diuron	330-54-1	µg/L	90
Endossulfan (α β e sais) (3)	115-29-7; I (959-98-8); II (33213-65-9); sulfato (1031-07-8)	µg/L	20
Endrin	72-20-8	µg/L	0,6
Glifosato + AMPA	1071-83-6 (glifosato) 1066-51-9 (AMPA)	µg/L	500
Lindano (gama HCH) <sup>(4)</sup>	58-89-9	µg/L	2
Mancozebe	8018-01-7	µg/L	180
Metamidofofos	10265-92-6	µg/L	12
Metolacoloro	51218-45-2	µg/L	10
Molinate	2212-67-1	µg/L	6
Parationa Metilica	298-00-0	µg/L	9
Pendimentalina	40487-42-1	µg/L	20
Permetrina	52645-53-1	µg/L	20
Profenofós	41198-08-7	µg/L	60
Simazina	122-34-9	µg/L	2
Tebuconazol	107534-96-3	µg/L	180
Terbufós	13071-79-9	µg/L	1,2
Trifluralina	1582-09-8	µg/L	20



## **APÊNDICE**

**Tabela A:** Condições Cromatográficas das análises utilizando a Synergi RP-80 Å.

Figura	Modo de Análise	B – Tempo % - (min)	Fase Móvel (FM)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (° C)	Volume de Injeção (µL)	Tempo de Análise (min)
6	Exploratório	5% - 1 min 100% - 60 min	ACN: H <sub>2</sub> O	0,8	30	20	60
7	Gradiente	50% - 5 min; 50/60% - 8 min; 60/65% - 40 min;	ACN: H <sub>2</sub> O	0,8	30	20	40
8	Gradiente	50% - 5 min; 52% - 8 min; 53% - 10 min; 54% - 12 min; 55% - 14 min; 56% - 16 min; 57% - 18 min; 58% - 19 min; 59% - 20 min; 60% - 22 min; 61% - 24 min; 62% - 26 min; 63% - 28 min; 64% - 30 min; 65% - 32 min; 66% - 34 min; 67% - 36 min; 68% - 38 min; 70% - 40 min.	ACN: H <sub>2</sub> O	0,8	30	20	60
9	Isocrático	75/25%	ACN: H <sub>2</sub> O	0,8	40	20	60

**Tabela B:** Condições Cromatográficas da análise utilizando a Luna-100 Å.

Figura	Modo de Análise	B – Tempo % - (min)	Fase Móvel (FM)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (° C)	Volume de Injeção (µL)	Tempo de Análise (min)
10	Gradiente	50% - 5 min; 55% - 8 min; 57% - 10 min; 59% - 12 min; 61% - 14 min; 63% - 16 min; 65% - 18 min; 67% - 19 min; 69% - 20 min; 71% - 22 min; 73% - 24 min; 75% - 26 min; 75% - 30 min; 50% - 40 min;	ACN: H <sub>2</sub> O	0,8	45	20	51

**Tabela C:** Condições Cromatográficas das análises utilizando a Kinetex-100 Å e HS- 120 Å.

Figura	Modo de Análise	B – Tempo % - (min)	Fase Móvel (FM)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (° C)	Volume de Injeção (µL)	Tempo de Análise (min)
11	Gradiente	5% - 5 min; 10% - 8 min; 12% - 10 min; 14% - 12 min; 16% - 14 min; 18% - 16 min; 20% - 18 min; 22% - 19 min; 24% - 20 min; 28% - 24 min; 30% - 26 min; 32% - 28 min; 34% - 30 min; 36% - 32 min; 38% - 34 min; 40% - 36 min; 42% - 38 min; 44% - 40 min; 46% - 42 min; 48% - 44 min; 50% - 46 min; 52% - 48 min; 54% - 50 min; 56% - 52 min; 58% - 54 min; 60% - 56 min;	ACN: H <sub>2</sub> O	0,8	45	20	56
12	Gradiente	50% - 5 min; 60% - 20 min; 70% - 25 min; 50% - 40 min;	ACN: H <sub>2</sub> O	0,8	A: 35 - B: 30	20	41

**Tabela D:** Condições Cromatográficas das análises utilizando a Synergi RP-80 Å e metanol.

Figura	Modo de Análise	B – Tempo % - (min)	Fase Móvel (FM)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (° C)	Volume de Injeção (µL)	Tempo de Análise (min)
13	Gradiente	50% - 0,01 min; 50% - 5 min; 60% - 8 min; 61% - 10 min; 62% - 11 min; 63% - 12 min; 64% - 13 min; 65% - 14 min; 66% - 15 min; 67% - 17 min; 68% - 20 min; 70% - 22 min; 72% - 24 min; 74% - 26 min; 76% - 28 min; 78% - 30 min; 80% - 32 min; 82% - 34 min; 84% - 36 min; 86% - 38 min; 88% - 40 min; 90% - 42 min; 50% - 60 min.	MeOH: H <sub>2</sub> O	0,8	40	20	60
14	Exploratório	5% - 1 min 100% - 60 min	MeOH: H <sub>2</sub> O	0,8	35	20	60

**Tabela E:** Condições Cromatográficas das análises utilizando a Synergi RP-80 Å e variação de fluxo.

Figura	Modo de Análise	B – Tempo % - (min)	Fase Móvel (FM)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (° C)	Volume de Injeção (µL)	Tempo de Análise (min)
15 - A	Gradiente	50% - 0,01 min; 50% - 8 min; 50/65% - 25 min; 65/50% - 35	ACN: H <sub>2</sub> O	1,0	30	20	35
15 - B	Gradiente	50% - 0,01 min; 50% - 8 min; 50/65% - 25 min; 65/50% - 35	ACN: H <sub>2</sub> O	0,8	30	20	35
15 - C	Gradiente	50% - 0,01 min; 50% - 8 min; 50/65% - 25 min; 65/50% - 35	ACN: H <sub>2</sub> O	0,6	30	20	35
15 - D	Gradiente	50% - 0,01 min; 50% - 8 min; 50/65% - 25 min; 65/50% - 35	ACN: H <sub>2</sub> O	0,4	30	20	35

**Figura A:** Curvas analíticas dos agrotóxicos.

